

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 3 рази на рік
Засновано у липні 2006 року

№ 3(50)
2020

Одеса
ОНУ
2020

Засновник
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В. О. Іваниця (Одеса, Україна)
ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т. О. Філіпова (Одеса, Україна)
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т. В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпро, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Мощі (Тукуман, Аргентина), І. І. Панчук (Чернівці, Україна), М. В. Патика (Київ, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), Л. Ф. Суходуб (Суми, Україна), Ф. І. Товкач (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія).

Науковий редактор випуску В. О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

**Відповідно до наказу МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.
входить до Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»).**

Видання реферується та індексується в наукометричних базах даних: «Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.urau.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Т. В. Іваниця, І. В. Райко
Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2020

Establisher
by Odesa National Mechnykov University.
Registration of state certification: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), I. I. Panchuk (Chernivtsi, Ukraine), M. V. Patyka (Kyiv, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine), L. F. Sukhodub (Sumy, Ukraine) F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine),

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

According to the order of the Ministry of Education and Science of Ukraine № 1301 from 15.10.2019 it is included in the List of scientific professional editions of Ukraine (category "B").

The edition is referenced and indexed in the scientific metric databases: «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List, Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukraine (journal.uran.ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Research Bib, e-LIBRARY, IBI Factor

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: T. V. Ivanytsia, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,

e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

<http://mbt.onu.edu.ua>

© Odesa National Mechnykov
University, 2020

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

Н.В. Титаренко, Н.І. Теслюк, В.О. Іваниця ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА ТКАНИН РОСЛИН.....	6
--	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Є.А. Шестеренко, І.І. Романовська ОТРИМАННЯ S-ЕНАНТІОМЕРІВ ЕСТЕРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН- 2-ОНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ	32
---	----

В.О. Іваниця, М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук, Н.Ю. Васильєва, Й. Калиновський СІКВЕНС ГЕНОМУ <i>VACILLUS PUMILUS</i> ONU 554, ІЗОЛЬОВАНОГО З ГЛИБОКОВОДНИХ ДОННИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ	46
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	58
---	----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

N.V. Tytarenko, N.I. Tesliuk, V.O. Ivanytsia PERSPECTIVES OF USING BACTERIA FOR CELL AND TISSUE PLANT CULTURE	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

Ye.A. Shesterenko, I.I. Romanovska PREPARATION OF S-ENANTIOMERS OF 3-HYDROXY-1,4-BENZDIAZEPIN- 2-ONE ESTERS BY BIOTECHNOLOGICAL WAY	32
--	----

V.O. Ivanytsia, M.D. Shtenikov, A.M. Ostapchuk, N.Y. Vasylieva, J. Kalinowski SEQUENCING OF THE GENOME BACILLUS PUMILUS ONU 554 ISOLATED FROM DEEP WATER SEDIMENTS OF BLACK SEA	46
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	58
------------------------------------	----

Н.В. Титаренко, Н.І. Теслюк, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(048) 746 61 02, e-mail: tatti383@gmail.com

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА ТКАНИН РОСЛИН

*В огляді представлені дані сучасних джерел літератури про взаємодію бактерій та рослин. Наведено особливості співіснування рослин і епіфітних та ендоефітних мікроорганізмів у природних умовах і в культурі *in vitro*. Освітлено переваги взаємодії рослин і бактерій та проблеми відсутності мікробіоти у саджанців рослин при мікроклональному розмноженні. Детально описано досвід використання мікроорганізмів у культурі клітин та тканин рослин. Описано процеси інокуляції бактерій на мікроклони рослин. Також розглянута культура рослин *in vitro* як модель взаємодії бактерій та рослин. Освітлено ріст-стимулювальні та антагоністичні властивості бактерій роду *Bacillus*, що потенційно можуть мати корисний вплив на рослини під час адаптації до умов *ex vitro*. Розглянуто перспективи використання бактерій роду *Bacillus* на етапі акліматизації рослин до умов *ex vitro*. Наведено приклади успішного використання бактерій роду *Bacillus* для стимуляції росту рослин та для захисту від патогенів.*

*Ключові слова: взаємодія бактерій та рослин, мікроклональне розмноження, бактерії роду *Bacillus*, адаптація від умов *in vitro* до *ex vitro*.*

Життєвий цикл рослин передбачає контакт із бактеріями протягом усього існування. Разом із іншими мікроорганізмами вони впливають на різноманітні метаболічні процеси у рослин та є важливими регуляторами процесів їх життєдіяльності.

Патогенні мікроорганізми, а також комахи-шкідники та несприятливі умови навколишнього середовища можуть бути серйозною загрозою для росту і розвитку рослин. Проте, корисні бактерії можуть бути використані як захист рослин проти перелічених негативних чинників. Такі бактерії можуть мати різноманітні механізми позитивного впливу на рослини:

- запобігання хворобам рослин;
- регуляція росту;
- допомога у подоланні стресових умов;
- інактивація речовин, що забруднюють ґрунт;
- зміна метаболізму таким чином, що рослина стає непридатною для споживання.



Приблизно 25% врожаю у світі втрачається кожного року. Переважно, це відбувається через захворювання, спричинені грибами, іншими патогенами та шкідниками. Засоби для захисту рослин сьогодні широко представлені на ринку для боротьби із цими захворюваннями. На сьогоднішній день, це, здебільшого, хімічні препарати, використання яких може бути загрозливим для здоров'я людей та забруднювати середовище. Контроль захворювань за допомогою корисних мікроорганізмів є альтернативним шляхом, що дозволить вести сільське господарство безпечно для населення і середовища. Використання мікробних препаратів для захисту рослин зустрічається все частіше, а їх важливість буде тільки зростати, у тому числі, з огляду на політичний та суспільний тиск.

Чисельність населення у світі збільшується, і тому кількість їжі, необхідної у 2050 році, буде удвічі більшою, ніж та, що виробляється зараз. У той самий час, площі культивованих земель поступово скорочуються. Однією з основних задач людства є підвищення кількості врожаїв безпечним для середовища способом – наприклад, заміною хімічних регуляторів росту рослин на мікробіологічні. Очевидно, що використання потенціалу певних бактерій може суттєво допомогти із рішенням цієї проблеми [13].

Окрім того, велика частина сільськогосподарських угідь потерпає від посухи чи засолення. Глобальне потепління сприятиме розширенню таких зон. Дуже сухі або засолені ґрунти унеможливають їх ефективне використання як орних земель через пригнічення росту рослин. На сьогодні вже було ефективно доведено, що деякі бактерії можна успішно застосовувати для пом'якшення подібних стресових умов [78, 80, 86].

Хімічне забруднення ґрунтів також може значно сповільнити або взагалі припинити ріст рослин. Навіть за умови, що сільськогосподарські рослини все-таки можуть рости на таких землях, врожай часто виявляється забрудненим та непридатним для споживання. Але цю проблему можна подолати – деякі мікроорганізми вже були успішно використані для детоксикації хімічних забруднювачів ґрунту та видалення важких металів, що дозволяло виростити здорові рослини.

Таким чином, вивчаючи взаємодії рослин та бактерій загалом, можна успішно використовувати набуті знання для вирішення загальносвітових продовольчих та екологічних проблем.

Мета роботи – розгляд та узагальнення сучасних наукових досліджень про взаємодію бактерій та рослин і вивчення перспектив використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин.

Якщо розглядати значення мікроорганізмів у життєдіяльності рослин предметно, то варто відзначити, що асоційовані з рослинами бактерії формують як епіфітні, так і ендofітні популяції у різних рослинах [78], включаючи меристемні клітини чи пилки. Сукупність популяцій бактерій, що колонізують рослину, мають назву мікробіом [78].

Найбільше різноманіття бактерій, що контактують з рослинами, знаходиться у прикореневій зоні – тут живе величезний спектр мікроорганізмів, метаболіти яких тісно взаємодіють з метаболітами рослин. Саме через корені бактерії найчастіше проникають всередину рослини, хоча, це можливо також



і через інші вегетативні та генеративні органи. Часто бактерії колонізують цілу рослину [21] і можуть передаватися через покоління як вертикально – через статеве розмноження, так і горизонтально – через вегетативне.

Корені рослин та зона у декілька міліметрів навколо них формують ризосферу – складний комплекс взаємодій підземної частини рослини із мікробіотою ґрунту. За аналогією з цим терміном було створено також поняття філосфера – надземна частина рослин, що є «біомом» для мікроорганізмів. У ризосфері зазвичай панує ендofітна мікробіота, а у філосфері - здебільшого епіфітна.

Переваги асоціацій рослин та бактерій

Корисний вплив бактерій на рослини залежить від специфіки видових характеристик та взаємодій між ними. Певні бактерії здатні продукувати не тільки рослинні фітогормони, але і інші регулятори росту, невластиві рослинам, що можуть впливати на життєдіяльність останніх. Наприклад, дослідження Vereecke та ін. [81] показало, що супернатант середовища з *Rhodococcus fascians*, що спричиняє *in vivo* та *in vitro* деформації органів рослин (галли, стеблові фасції і т.п.), містив 11 окремих цитокінінів, що впливали на метаболізм рослин. Цей вплив розповсюджувався також і на морфогенез *in vitro*. Інший приклад – родестрин. Цей фітогормон, що подібний до ауксинів, але не синтезується рослинами, було отримано з бактерії *Rhodobacter sphaeroides* [70]. На сьогодні відомо, що ауксини великої групи бактерій здатні безпосередньо впливати на розвиток кореневої системи рослин, посилюючи абсорбцію поживних речовин та води із ґрунту [57].

Бактерії здатні не тільки продукувати регулятори росту рослин, але і стимулювати синтез та розподіл цих сполук всередині рослини [80]. Цитокініни подовжують час асиміляційних процесів у листі, підвищуючи кількість продуктів фотосинтезу і замінюючи рослинні цитокініни, що було втрачено через засушливі умови середовища [7]. Giron та ін. [30] підкреслювали роль бактеріальних цитокінінів як ключових регуляторів ростових та захисних процесів.

Бактеріальні гібереліни підтримують ріст рослин незалежно та у взаємодії із іншими гормонами [14]. Рівень етилену може знижуватися завдяки бактеріальній 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаміназі, таким чином, знижується сприйнятливість рослин до стресів [65].

Індоліл-оцтова кислота (ІОК) бактеріального походження відома як проміжний чинник формування рослинно-бактеріальних взаємодій [46]. Бактерії, асоційовані з резистентністю до хвороб, можуть також працювати як чинники біоконтролю. Зменшена сприйнятливість до патогенів може бути пов'язана із впливом конкурентної колонізації тканин, або з антибіозисом – шляхом зміни метаболізму, знищення патогенів або їх токсинів чи чинників вірулентності завдяки активації (праймінгу) систем резистентності рослини [21].

Бактерії також роблять свій внесок у захисті рослин від тварин-шкідників. Aballay та ін. [1] виявили, що 7 бактерій, ізольованих з винограду, скоротили популяцію нематод та потенційну шкоду для вирощених *in vitro* рослин винограду в тепличних умовах.

Захист від абіотичних стресів може бути результатом впливу речовин, які



змінюють відповідь на стрес або стимулюють рослину активувати метаболічні реакції, пов'язані з толерантністю до стресу. Це такі речовини, як осмопротектори – гліцин, бетаїн або пролін [34]. Наприклад, *Burkholderia phytofirmans* PsJN може адаптувати рослини винограду до холоду шляхом модифікації вуглеводного обміну, що нагадує природну акліматизацію [28], і шляхом модифікації системи антиоксидантного захисту [72]. До бактерій, що забезпечують захист від посухи, відносяться *Azospirillum brasilense* (покращення водного балансу у пшениці), *Achromobacter piechaudii* (системна толерантність перцю та помідорів, спричинена АЦК-деаміназою), *Bacillus megaterium* (підвищення рівня ІОК та проліну у *Trifolium*), *Pseudomonas mendocina* (підвищена стійкість рослин салату до посухи через покращення антиоксидантного статусу), *Pseudomonas polytuxa* (змінений гормональний баланс та провідність у стеблах *Phaseolus vulgaris*) [34].

Інші дослідження [64] повідомляли, що бактерії трьох видів – *Pseudomonas plecoglossicida*, *Acinetobacter calcoaceticus* та *Sphingobacterium canadense* здатні захищати рослини винограду від посухи. *Pseudomonas fluorescens* YsS6 та *P. migulae* 8R6 синтезують АЦК-деаміназу та суттєво знижують шкідливий ефект від засолених ґрунтів при вирощуванні помідорів [3]. Серед загальних особливостей цих бактерій є вироблення ІОК, здатність до розчинення фосфатів, стійкість до 20% поліетиленгліколю і здатність рости в температурних межах від 4 до 42 °С [65].

Бактерії також можуть покращити рослинний метаболізм, виробляючи позаклітинні летючі (від англ. volatiles) речовини [40]. Наприклад, *Bacillus subtilis* GB03 виділяє летючі метаболіти, які в довгостроковій перспективі стимулюють ріст, ефективність фотосинтезу, накопичення заліза і призводять до більшого врожаю насіння в *Arabidopsis thaliana* [84]. Летючі речовини *Bacillus badius* M12 стимулювали регенерацію пагонів з калусу у *Sesamum indicum* та збільшували вміст хлорофілу, каротиноїдів та фенолів, індукували органогенез у калусах тютюну [33]. *Zamioudis* та ін. [85] показали, що три штами *Pseudomonas spp.*, ізольовані з ризосфери, крім забезпечення захисту від абіотичних стресів та активізації системи захисту від низки хвороб, мали можливість перепрограмувати режим росту первинних корінців у *Arabidopsis thaliana*.

Ендofітні бактерії також можуть брати участь у захисті фотосистем рослин від екстремальних умов навколишнього середовища шляхом активації гормонозалежної системи захисту рослин та покращення транспорту електронів у фотосистемі II [16]. Різноманітний позитивний вплив мікроорганізмів після інокуляції їх на рослини іноді називають «праймінг». Після процедури «праймінгу» рослини можуть швидше та ефективніше реагувати на майбутній стрес [31].

Багато ендofітів існують у рослинах у стані спокою, підтримуючи базовий метаболізм, але вони можуть відновити активний стан при зміні умов навколишнього середовища. Було встановлено, що ендогенна бактеріальна популяція може бути активована шляхом додавання корисних бактерій до середовища росту [4]. Також відомо, що інокуляція рослин картоплі штамом *Methylobacterium* індукувала систему захисту рослин від бактеріальних та



грибкових збудників із силою, залежною від штаму та щільності інокулята патогена. *Methylobacterium* сам по собі не мали антагоністичної активності проти патогенів, але інокуляція суттєво змінила склад всієї популяції ендоефітів у рослинній тканині і тим самим підвищила ступінь резистентності. Це показує, що вплив бактерій, що вводяться в рослинні тканини, також може активувати інші наявні ендоефіти [6].

Однак, не завжди зрозуміло, чи прискорений ріст або підвищена стійкість є результатом виключно бактеріальних метаболітів, або також завдяки індукції генетичного апарату рослини ендоефітними метаболітами. На думку Ludwig-Muller [45], рослини та ендоефіти є рівноправними партнерами у виробництві вторинних метаболітів і можуть взаємодіяти під час синтезу сполук та створювати речовини, нові для обох організмів. Наприклад, Scherling та ін. [66] встановили, що в культурах тканин тополі, інокульованої *Paenibacillus sp. strain 22*, зазнали змін 11 метаболітів рослини, а особливо ті, що стосуються засвоєння азоту.

Дослідниками також були відзначені відмінності видового складу бактерій у різних органах рослин. Lucero та ін. [44], використовуючи мікробіологічні і мікроскопічні методи в комбінації з секвенуванням, виявили різноманітні консорціуми у регенованих коренях та листах двох видів *Atriplex*. Консорціуми склалися як з відомих бактерій, так і невідомих, а також грибів.

Бактерії в культурі рослин *in vitro*

Протягом багатьох років присутність бактерій в культурі клітин і тканин рослин ніяк не висвітлювалася у наукових джерелах та вважалася недоліком роботи дослідника, оскільки культури *in vitro* мають підтримуватися виключно у стерильних умовах. Однак, з часом стало зрозуміло, що, не дивлячись на поверхневу стерилізацію ініціальних експлантів, культури необов'язково є вільними від бактерій. Присутність певних бактерій може бути встановлена на початковій стадії введення експланта в культуру, але в інший час контамінація може не видавати себе до стадії розмноження, або навіть пізніше, коли на стадії акліматизації виникає значний сплеск росту бактерій.

Контамінація рослинних експлантів, виявлення та видалення бактерій-контамінантів вивчалися у різноманітних дослідженнях [63, 17, 27]. Проте, існує дуже мало робіт щодо виявлення корисних бактерій в культурі рослин *in vitro* [51, 53].

Мікроорганізми в культурі *in vitro*, навіть непатогенні або некультивовані, можуть мати негативний вплив на культури рослин та уповільнювати швидкість розмноження, чи навіть спотворювати результати наукових експериментів [77].

Не виявлені вчасно бактерії можуть почати розмножуватися у культурі після довгого періоду часу. Патогенна *Xanthomonas axonopodis* асимптоматично персистувала в культурах пагонів антуріуму протягом цілого року [50], і патогенна *Agrobacterium vitis* знаходилася в латентному стані в культурі пагонів *Vitis vinifera* протягом 14 тижнів [59].

На сьогодні існує достатньо доказів, що внутрішні тканини рослинних експлантів для культури *in vitro* колонізовані певною кількістю бактерій [63].



Вони є такими, що живуть вільно, а також такими, що живуть у рослинах, тваринах, переробленій їжі, сточних водах, та навіть є патогенами людини [29]. Наприклад, Thomas та ін. [76] виділили 14 ізолятів бактерій з апексу стебла папаї довжиною 1 см, що був поверхнево простерилізований. Бактерії виявилися приналежними до 9 родів, включаючи ті, що традиційно пов'язані з тваринами та людиною. Деякі з них розмножувалися на живильному середовищі тільки за присутності пагонів папаї чи екстрактів з них.

De Almeida та ін. [22] за допомогою електронної мікроскопії виявили бактеріальні ендосимбіонти всередині клітин пагонів персикової пальми, вирощуваних *in vitro*. Культура при цьому вважалася асептичною. Подальший аналіз цих ендосимбіонтів з використанням полімеразної ланцюгової реакції та електрофорезу у денатурувальному градієнтному гелі показав присутність трьох некультивованих видів бактерій, що показали схожість рРНК послідовностей до *Moraxella sp.*, *Brevibacillus sp.* та ціанобактерій. Подібний молекулярний аналіз, проведений Abreu-Tarazi та ін. [2], виявив бактеріальні ендосимбіоти, що належали до *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* та *Betaproteobacteria* в 5-річній асептичній культурі ананасу, поверхнево простерилізованій перед виділенням ДНК.

Автори спостерігали відмінності видового складу 13 родів від меристемних експлантів 6 культиварів *Aglaonema*, при цьому 30% ізольованих колоній складала *Pseudomonas aeruginosa*. У дослідженні бактерій-контамінантів культур рослин *in vitro*, проведених у Польщі, було виявлено 108 ізолятів декількох родів. Найбільш широко представленими були роди *Bacillus*, *Methylobacterium* і *Pseudomonas* [39]. Всі ізоляти у цьому дослідженні, за виключенням деяких стафілококів, були отримані з живих, візуально здорових експлантів.

Незважаючи на те, що бактерії не завжди вдається виявити, вони можуть продовжувати негативно впливати на культуру рослин *in vitro* [74, 75]. Наприклад, бактерії *Bacillus circulans*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Staphylococcus huminis* та *Micrococcus kristinae* знижували рівень проліферації у культурах пагонів абрикосу [47]. Перелічені бактерії змінювали склад живильного середовища, а також склад повітря навколо експланту у ємності для культивування, що негативно впливало на ріст культури.

«Звикання» (англ. *habituation*) рослинних культур *in vitro* відомо достатньо давно і також може бути результатом бактеріальної контамінації. Це дозволяє рослинним культурам у певний момент продовжувати рости за відсутності екзогенних фітогормонів у середовищі. Порівняння транскриптів рослин зі «звиканням» та без нього виявили різну експресію 800 генів у клітинах *Arabidopsis thaliana*, включаючи гени, що кодують рецептори до цитокініну [58]. Враховуючи велику складність у виявленні ендосимбіотних мікроорганізмів, якнайменше деякі випадки «звикання» можуть розглядатися як зміна балансу гормонів, спричинена метаболічною активністю ендосимбіотів. Це можливо завдяки тому, що ендосимбіоти здатні синтезувати ауксини, цитокініни, гібереліни та інші фітогормони [42, 83].

Досвід використання бактерій у культурі рослин *in vitro*

Тісне співіснування бактерій та рослин спонукало дослідників до спроб



імітації корисних симбіозів у рослинництві, включаючи мікроклональне розмноження. Прикладом ефективного практичного використання бактерій є дослід з *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Дані ґрунтові бактерії викликають патогенез у багатьох рослин та мають генетичний апарат, що дозволяє колонізувати рослинні клітини. Починаючи з 1980 року, модифіковані форми (позбавлені від генів бактеріального раку рослин) використовувалися як вектори для передачі необхідної генетичної інформації [55]. Модифіковані бактерії можуть внести специфічну генетичну конструкцію до ядра або пластиди рослини. Якщо ця конструкція стабільно приєднується до рослинної ДНК, вона може бути передана дочірнім клітинам. Регенерація цілих рослин з таких "генетично збагачених" клітин лежить в основі трансгенезу, і є прекрасним джерелом нової генетичної мінливості, яку можна використовувати в селекції рослин [87].

Багато таксонів бактерій було виділено з культур рослин *in vitro*, і найімовірніше деякі з них показали можливість збільшити темпи росту рослин або впливати на морфогенез. Для наукових досліджень чи виробництва іноді простіше організувати оптимальні умови у культурі *in vitro*, ніж вирощувати рослини *ex vitro*. Рослини, які є складними для культивування, не мають ефективної регенерації на середовищі, високого коефіцієнту розмноження або вкорінення, можуть підтримуватися у культурі завдяки інокуляції корисними бактеріями. Наприклад, *Rhodobacter sphaeroides* синтезує фітогормон родестрин, посилюючи ефективність вкорінення пагонів шовковиці [70], а *Bacillus spp.* продукує ІОК, що сприяє вкоріненню полуниці [24]. Quambusch та ін. [60] виявили зв'язок між ендоефітними бактеріями та ефективністю мікророзмноження генотипів *Prunus avium*.

Іноді несподівана морфологія або незвичний приріст культур можуть мати місце завдяки активності ендоефітних бактерій. Наприклад, культури бузини, природно заражені *Methylobacterium*, утворюють менше за кількістю, але більше за довжиною додаткових пагонів порівняно з незараженими. Пагони малини, контаміновані *Curtobacterium*, є більш колючими та довгими порівняно з тими, що не контаміновані. Ці та інші бактерії були виділені та випробувані на культурах троянди, хризантеми та гербери *in vitro*. Жодна з бактерій не завдала шкоди експлантам, і деякі комбінації бактерій та видів рослин суттєво покращили розмноження та вкорінення [86]. У цьому дослідженні бактерії роду *Curtobacterium* збільшили проліферацію пагонів рослин усіх трьох видів, а також вкорінення троянди, *Methylobacterium* підвищили продуктивність гербери, а *Bacillus* підвищили довжину пагонів хризантем.

Найважливіша роль корисних бактерій у сфері мікророзмноження пов'язана з акліматизацією клонованих рослин, що часто виявляється складним етапом з великою часткою втраченого рослинного матеріалу. Продихи, що слабо функціонують, погано розвинені коренева система та фотосинтетичний апарат ускладнюють адаптацію для мікророслин в нестерильних умовах зі змінними параметрами оточуючого середовища. Інокуляція рослин корисними бактеріями на останній стадії мікророзмноження або в період адаптації може допомогти у подоланні цієї проблеми [51, 56]. Бактерії, що належать до 13 родів (*Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*,



Enterobacter, *Halomonas*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Methilophylus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas* та *Sphingopyxis*) у дослідженнях спричиняли позитивний ефект на процеси мікророзмноження, та у деяких випадках були вивчені механізми, що відповідали за підвищення продуктивності рослин. Бактерії стимулювали подовження пагонів, збільшували масу пагонів, кількість листків, ріст додаткових пагонів, прискорене вкорінення, збільшували темпи укорінення пагонів, збільшували кількість і довжину коренів, індукували соматичний ембріогенез та допомагали акліматизації рослин до умов *ex vitro*.

***In vitro* та *ex vitro* інокуляція рослин**

Використання певних бактерій для підтримки росту рослин, біозахисту та як біодобрив сьогодні є дуже перспективним напрямом в Україні та світі. Це екологічно та економічно виправдано, оскільки дозволить зменшити об'єми використання мінеральних добрив та пестицидів, а також скоротить витрати на їх виробництво. Бактеріальна інокуляція має особливе значення у, так званому, органічному рослинництві. Дуже багато видів бактерій було ідентифіковано як корисні для рослин, але їх реальна ефективність не була доведена у реальних польових дослідженнях, або такі дослідження взагалі не проводилися [54].

Ефективність препаратів на основі живих організмів дуже залежить від умов навколишнього середовища. Особливо складним моментом є підтримка високої щільності популяції бактерій у ґрунті під час колонізації рослин. Дослідження мають зосереджуватися на пошуку найбільш ефективних бактерій, включаючи покращені генно-інженерні штами, стійкі до неоптимальних умов навколишнього середовища. Пріоритетним є також створення штучних консорціумів мікроорганізмів, які принаймні частково імітують природний рослинний мікробіом – численний та багатофункціональний. Іншою проблемою є виявлення або створення сортів рослин, що будуть ефективно заохочувати взаємодію з корисними бактеріями [54].

Історія бактеріальної інокуляції детально розглядалася у минулому різними авторами [10], а ідея застосування бактерій для підвищення ефективності мікророзмноження виникла понад три десятиліття тому. Можливість покращення мікророзмноження рослин в культурі *in vitro* за допомогою деяких бактеріальних «контамінантів» спочатку була запропонована ще у 1987 році дослідником Herman [36]. Про результати інокуляції рослинних культур повідомляли також Digat та ін. [25], які виявили позитивний вплив бактерій *Pseudomonas fluorescens* та *P. putida* на вкорінення та акліматизацію мікропагонів примули. Подальші роботи показали корисний вплив *Pseudomonas sp.* та *P. mucidolens* у попередженні надлишкової оводненості культур орегано та малини [79].

Nowak [51] розглянув ідею *in vitro* інокуляції експлантів після спостереження низки корисних ефектів, спричинених деякими бактеріями в культурах *in vitro*. Дослідник наголошував і на корисному впливі бактерій на рослини і після виходу з культури *in vitro*.

Клоновані рослини піддаються підвищеному навантаженню під час переведення в умови *ex vitro*, коли вони повинні стати повноцінними автотроф-



ними організмами. У цей період слабкий розвиток провідних і покривних тканин, недостатність функціональних коренів, сухість листя, погане функціонування фотосинтетичного апарату, зараження хвороботворними мікроорганізмами становлять реальну загрозу гибелі для рослини.

Корисні бактерії можуть допомогти в боротьбі зі стресом не тільки шляхом синтезу регуляторів росту, поглинання поживних речовин та прямого чи непрямого захисту від стресів, але і шляхом ініціювання власних реакцій захисту рослин у процесі біогарденінгу (англ. biohardening) або праймінгу [18, 56]. Цей процес широко описаний у культурі картоплі [52]. Comprant та ін. [21] зазначали, що корисні бактерії, які використовуються при інокуляції експлантів на стадії *in vitro*, здатні стимулювати індукцію захисних реакцій, що може бути вирішальним у подоланні акліматизаційного стресу.

Хоча в технічному відношенні інокуляція експлантів під час культивування *in vitro* є відносно легкою, слід дотримуватися деяких умов стосовно таких параметрів, як щільність і температура інокуляції [5]. Як було сказано вище, внесення бактерій не завжди є раціональним на стадії розмноження *in vitro*, але може значно допомогти під час акліматизації та додається на стадії адаптації після промивання коренів, або у субстрат для росту. Приклади інокуляції включають *Rhizobium* для *Robinia* [8] або *Bacillus* для банану [69]. Ефект інокуляції до або під час акліматизації може залишатися також під час вирощування у відкритому ґрунті, позитивно впливаючи на ріст та врожайність рослин постійною присутністю бактерій у рослинах або роботою захисних процесів, активованих ще на попередніх стадіях росту.

Незважаючи на те, що інокулювати експланти в культурі *in vitro* доволі просто, дана стратегія не є кращою у всіх випадках. Thomas та ін. [73] встановили, що інокуляція на стадії вкорінення *in vitro* мікропагонів чаю з *Pseudomonas fluorescens* та *Azospirillum brasilense*, виділеними з диких рослин цього ж виду, не є ефективною, оскільки перший мікроорганізм не колонізує мікроклони, а другий дає рясний приріст на середовищі та гальмує ріст пагонів. Однак, коли ці бактерії були додані до субстрата під час акліматизації в теплиці, вони збільшили приживлюваність на 30% для *Pseudomonas fluorescens* та на 60% для *Azospirillum brasilense*, та стимулювали ріст коріння та пагонів. Перевага використання бактерій для покращення росту та праймінг для підвищення стійкості проти стресів все ще залежить від генотипів бактерій та рослин-господарів, а також умов вирощування як *in vitro*, так і *in vivo*.

Культура рослин *in vitro* як модель взаємодії бактерій та рослин

Спосіб використання бактерій та визначення відповіді на їх вплив рослин в умовах *in vitro* є важливими чинниками, які слід враховувати при попередньому відборі відповідних мікроорганізмів як біопротекторів або біодобрив для застосування у польових умовах. Наприклад, було вивчено вплив *Burkholderia phytofirmans* PsJN на здатність культур винограду *in vitro* протистояти низьким температурам (4 °C), використовуючи як маркери масу коренів рослин [9], активність антиоксидантної системи [72] та вуглеводного обміну [28]. Чутливість рослин картоплі до високих температур (33 °C) була знижена в лабораторних умовах за допомогою PsJN і виражена збільшенням



довжини стебла, біомаси пагона і кореня, та посиленням бульбоутворення після виходу з *in vitro* [11].

Rakotoniriana та ін. [62] випробували *in vitro* можливість захисту *Centella asiatica* від *Colletotrichum higginsianum* за допомогою *Bacillus subtilis* BSA31. Gonzalez та ін. [32] виявили, що мікропагони рослин жожоба, інокульовані *in vitro* з *Azospirillum brasilense*, є менш чутливими до NaCl у середовищі, що виражається збереженням здатності рослин до укорінення. *B. phytofirmans* PsJN інокульовали на мікропагони винограду, що забезпечило їм захист проти сірої цвілі. Це вказує на можливість використання даного мікроорганізму в польових умовах з тією самою метою.

Культури *in vitro* на сьогодні були використані для вивчення потенціалу бактерій як біодобрив у декількох дослідженнях. Wang та ін. [82] випробували вплив *in vitro* PsJN на рослинах проса і виявили, що інокульовані саджанці мали більшу біомасу – це є дуже хорошою ознакою, що може свідчити про придатність використання цієї бактерії під час вирощування польових культур. Guglielmetti та ін. [35] *in vitro* випробували вплив *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 на ріст коренів у саджанців ячменю. Даний мікроорганізм синтезує ІОК і молекули, що хелатують йони заліза та розчиняють фосфат кальцію для підвищення біодоступності мінеральних речовин у ґрунті. Таким чином, було встановлено на прикладі культури мікроклонів, що *L. rhizovicinus* MIMR1 є потенційно хорошим кандидатом для застосування як компонент біодобрива. Montanez та ін. [48] і Naveed та ін. [49], підтвердили, що метод, який використовує культуру *in vitro* для тестування корисного впливу бактерій на стимулювання росту кукурудзи, може бути використаний для попереднього відбору цих мікроорганізмів як інокулянтів в умовах відкритого ґрунту.

Перспективи використання бактерій роду *Bacillus* на етапі акліматизації рослин до умов *ex vitro*

Певні представники грампозитивних родів *Bacillus* та *Paenibacillus* виявляють здатність колонізувати рослини і тим самим позитивно впливати на їх ріст і здоров'я. На даний час бацили є найбільш широко використовуваними бактеріями на ринку біопестицидів [13]. В основному, це пов'язано з їх здатністю утворювати стійкі ендоспори, що дозволяє виробляти стабільні біопрепарати із тривалим терміном зберігання. Бактерії виду *B. subtilis*, а також подібні до них *B. amyloliquefaciens* та *B. pumilus*, виявилися ефективними у сприянні росту рослин та біоконтролю проти рослинних патогенів. Штами *B. subtilis* та *B. amyloliquefaciens* важко диференціювати один від іншого, і тому нерідкою є ситуація, коли препарати, що складаються зі спор *B. subtilis*, насправді містять у складі асоційовані з рослиною *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* [13].

Бактерії роду *Bacillus*, що використовуються як основа для створення біопрепаратів, відрізняються за характером метаболізму. Наприклад, *B. amyloliquefaciens* є суворим аеробом, у той час як *B. licheniformis* та *B. pumilus* – факультативні анаероби. Різними є також і механізми стимулювального та захисного впливу на рослини у мікроорганізмів даного роду. *B. firmus* GB126 здатний контролювати чисельність нематод у прикореневій



зоні рослин (комерційна назва – BioNem AgroGreen), а препарат BioArc на основі *B. megaterium* використовується як фунгіцид. Бактерії виду *Paenibacillus polymyxa* здатні стимулювати ріст рослин шляхом синтезу фітогормонів (ІОК, цитокінінів, гіберелінів, етилену) та специфічних летючих речовин. Вони також здатні до фіксації азоту та синтезу великого спектру вторинних метаболітів з антибактеріальними та фунгіцидними властивостями. Споріднений вид *P. mucilaginosus* здатний переводити нерозчинні мінеральні сполуки ґрунту у розчинний стан, вивільнюючи корисні для рослин йони натрію та фосфору [13].

Згідно з новими дослідженнями [68], перспективними щодо стимуляції росту та захисту рослин від патогенів є штами роду *Bacillus*, виділені з незвичних біотопів – наприклад, з донних відкладень Чорного моря. Геном штама *B. velezensis* ONU 553 було детально проаналізовано та виявлено здатність цього мікроорганізму до синтезу цілого спектру поверхнево-активних речовин, ліпептидів, сидерофорів, антимікотиків та антибіотиків. Враховуючи вищезазначене, *B. velezensis* ONU 553 володіє великим потенціалом у майбутніх дослідженнях його взаємодії з рослинами.

Одним з перших питань на шляху створення біопрепарату є ефективна колонізація рослини корисними бактеріями. Згідно з відомими на сьогодні дослідженнями [15, 20], штучне внесення бактерій роду *Bacillus* у ґрунт чи безпосередньо на корені рослин є доволі ефективним, але різні види рослин колонізуються не однаковою мірою, а кількість бактерій має тенденцію знижуватися з часом [41].

Здатність бацил підтримувати процеси росту і розвитку неодноразово спостерігалася у дослідженнях [13], але знання про молекулярні основи цього ефекту ще далеко не повні. На даний момент, основними способами корисного впливу на рослини вважаються:

1. Триптофан-залежний синтез фітогормону ІОК [71]
2. Летючі речовини, такі як 2,3-бутандіол та ацетоїн – вони включаються у біохімічні цикли рослини [13]
3. Синтез фітази – ферменту, що дозволяє отримувати розчинну форму фосфатів, доступну для рослин [38]
4. Фіксація азоту [78]
5. Секреція макромолекул, що руйнують певні ензими [13].

Окремим пунктом варто виділити також і захист рослин шляхом синтезу антимікробних сполук. На сьогодні у цьому плані найбільш відомим є *B. amyloliquefaciens* FZB42. При інокуляції на листя салату даний мікроорганізм ефективно пригнічував ріст фітопатогена *Rhizoctonia solani* [20]. Геномний аналіз показав, що приблизно 10% генома у цього штаму відповідають за синтез антимікробних метаболітів [12]. Ці метаболіти представлені сполуками різного біохімічного походження і структури. Наприклад, циклічні ліпептиди синтезуються поза рибосомами та є найсильнішими фунгіцидами (наприклад, бациломіцин D), що синтезує штам FZB42. Окрім того, циклічні ліпептиди відповідають за формування матриксу під час утворення біоплівки бактерій [19]. До групи полікетидів належить дифіцидин – найбільш активна антибактеріальна сполука штаму, що ефективно працює проти патогене-



ну рослин *Erwinia amylovora*. Інша антимікробна сполука *B. amyloliquifaciens* FZB42 – дипептид бацилізин, що також пригнічує ріст *Erwinia*, а також показав ефективність у боротьбі з *Microcystis aeruginosa* – головним агентом «цвітіння» прісних водоймищ.

Цікаво, що протягом довгого часу всі виявлені антимікробні сполуки білкового походження, синтезовані *B. amyloliquifaciens* FZB42, були продуктами нерибосомного синтезу [37]. Тільки після вивчення мутантного штаму, нездатного до нерибосомного синтезу, було виявлено, що *Bacillus* здатні і до рибосомного синтезу антимікробних пептидів. Виявлені сполуки, наприклад, плантазоліцин, показали здатність до пригнічення росту споріднених грампозитивних бактерій, а також помірну активність проти нематод [43]. У *B. amyloliquifaciens* FZB42 виявили також і бактеріоцини – амілоцикліцин [67]. Він показав себе у дослідженнях як пригнічувач патогена *Clavibacter michiganensis* та деяких грампозитивних бактерій.

Загалом, тільки у *B. amyloliquifaciens* FZB42 було виявлено близько 20 антимікробних сполук. Зважаючи на цей факт, у науковому середовищі довгий час вважалося, що саме вони у першу чергу відповідальні за стимуляцію росту та захист рослин. Але у подальшому було виявлено, що концентрація антимікробних сполук у ризосфері занадто мала для ефективної дії проти патогенів [23]. Тому більш вірогідним варіантом корисної дії на рослини вважається стимуляція Індукованої Системи Резистентності (ICP) рослини. ICP починає активно працювати, коли система захисних механізмів рослини індукується шляхом контакту з патогеном [26]. Було показано, що летючі органічні речовини та циклічні ліпопептиди бактерій роду *Bacillus* є стимуляторами ICP [61].

На даний момент проводиться багато польових досліджень щодо впливу різних бактерій роду *Bacillus* та препаратів на їх основі на рослини, а антагоністичні взаємодії з фітопатогенами та синтез метаболітів вивчаються в умовах *in vitro* в лабораторіях.

Узагальнення

Бактерії на сьогоднішній день широко і успішно використовуються як основа для створення біопрепаратів для захисту рослин. Вони є природними мешканцями ґрунту і часто формують симбіотичні відносини з рослинами у ризосферній зоні, нерідко колонізують внутрішній простір рослин. Дуже часто у цій ролі виступають саме бактерії роду *Bacillus*. Способи позитивного впливу бактерій при цьому дуже різноманітні: це і синтез фітогормонів, антибіотиків, специфічних летючих речовин, полегшення засвоєння мінеральних елементів з ґрунту, фіксація азоту тощо. На даний момент, у науковому середовищі як найважливіший механізм відмічається саме стимуляція індукованої системи резистентності, так званого «імунітету» рослини, що запускає ланцюг захисних реакцій проти фітопатогенів та допомагає рослині пережити несприятливі умови оточуючого середовища.

У свою чергу, мікроклонально розмножені рослини особливо потребують захисту від хвороб та несприятливих умов, оскільки мають слабо розвинену кореневу систему та транспіраційний апарат, і позбавлені жодного контакту з нестерильним повітрям та ґрунтом безпосередньо до етапу адаптації.



Зважаючи на вище перелічені властивості, бактерії роду *Bacillus* мають великий потенціал щодо їх використання під час виходу рослин із культури *in vitro* для підвищення рівня приживлюваності, захисту від патогенів та пом'якшення стресових умов вирощування у відкритому ґрунті.

Н.В. Титаренко, Н.І. Теслюк, В.А. Іваниця

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38(048) 746 61 02, e-mail: tatti383@gmail.com

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Реферат

*В обзоре представлены данные современных источников литературы о взаимодействии бактерий и растений. Приведены особенности сосуществования растений и эпифитных и эндофитных микроорганизмов в естественных условиях и в культуре *in vitro*. Освещены преимущества взаимодействия растений и бактерий и проблемы отсутствия микробиоты у саженцев растений при микроклональном размножении. Подробно описан опыт использования микроорганизмов в культуре клеток и тканей растений. Описаны процессы инокуляции бактерий на микроклоны растений. Также рассмотрена культура растений *in vitro* как модель взаимодействия бактерий и растений. Освещены рост-стимулирующие и антагонистические свойства бактерий рода *Bacillus*, которые могут иметь полезное влияние на растения во время адаптации к условиям *ex vitro*. Рассмотрены перспективы использования бактерий рода *Bacillus* на этапе акклиматизации растений к условиям *ex vitro*. Приведены примеры успешного использования бактерий рода *Bacillus* для стимуляции роста растений и для защиты от патогенов.*

*Ключевые слова: взаимодействие бактерий и растений, микроклональное размножение, бактерии рода *Bacillus*, адаптация из условий *in vitro* в *ex vitro*.*

N.V. Tytarenko, N.I. Tesliuk, V.O. Ivanytsia

Odesa I.I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082. Ukraine,
tel.: +38(048) 746 61 02, e-mail: tatti383@gmail.com

PERSPECTIVES OF USING BACTERIA FOR CELL AND TISSUE PLANT CULTURE

Summary

The review presents data from modern literature according the interaction of bacteria and plants. Peculiarities of coexistence of plants and epiphytic and endophytic microorganisms in natural conditions and in aseptic culture are given. The advantages of the interaction of plants and bacteria and the problems of lack of microbiota in plant seedlings during microclonal propagation are highlighted.



The experience of using microorganisms in the culture of plant cells and tissues is described in detail. The processes of bacterial inoculation on plant microclones are described. In vitro plant culture is also considered as a model of interaction between bacteria and plants. The growth-stimulating and antagonistic properties of bacteria of the genus Bacillus, which can potentially have a beneficial effect on plants during adaptation to ex vitro conditions, are highlighted. Prospects for the use of bacteria of the genus Bacillus at the stage of acclimatization of plants to ex vitro conditions are considered. Examples of successful use of bacteria of the genus Bacillus to stimulate plant growth and to protect against pathogens are given.

Key words: interaction of bacteria and plants, clonal micropropagation, bacteria of the genus Bacillus, adaptation from in vitro to ex vitro conditions.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Aballay E., Martensson A., Persson P.* Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants // *Plant Soil*. – 2011. – Vol. 347. – P. 313–325.
2. *Abreu-Tarazi M.F., Navarrete A.A., Andreote F.D., Almeida C.V., Tsai S.M., Almeida M.* Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE // *World J Microbiol Biotechnol*. – 2010. – Vol. 26. – P. 555–560.
3. *Ali S., Duan J., Charles T.C., Glick B.R.* A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp // *J Theor Biol*. – 2014. – Vol. 343. – P. 193 – 198.
4. *Andreote F.D., da Rocha U.N., Araujo W.L., Azevedo J.L., van Overbeek L.S.* Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*) // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2010 – Vol. 97. – P. 389 – 399.
5. *Ardanov P., Ovcharenko L., Zaets I., Kozyrovska N., Pirttila A.* Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Biol Control*. – 2011. – Vol. 56. – P. 43 – 49.
6. *Ardanov P., Sessitsch A., Haggman H., Kozyrovska N., Pirttila A.M.* Methylobacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – Art. 46802
7. *Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martinenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R.* Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // *Plant Soil*. – 2007. – Vol. 292. – P. 305 – 315
8. *Balla I., Vertesy J., Koves-Pechy K., Voros I., Bujtas Z., Biro B.* Acclimation results of micropropagated black locust (*Robina pseudoacacia* L.) improved by symbiotic micro-organisms // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. – 1998. – Vol. 52. – P. 113 – 115.
9. *Barka E.A., Nowak J., Clement S.* Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growthpromoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN // *Appl Env Microbiol*. – 2006.
10. *Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P.* Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) // *Plant Soil*. – 2014. – Vol. 378. – P. 1–33.



11. *Bensalim S., Nowak J., Asiedu S.K.* A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato // *Am J Potato Res.* – 1998.
12. *Borriss R.* Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growthpromoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // *de Brujn FJ (ed) Molecular microbial ecology of the rhizosphere.* – 2013. – Vol. 2. – P. 883–898
13. *Borriss R.* Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and bio-control agents // *Maheshwari DK (ed). Bacteria in agrobiology: plant growth responses.* – 2011. – P. 41–76.
14. *Bottini R., Cassan F., Piccoli P.* Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – Vol. 65. – P. 497–503.
15. *Budiharjo A., Chowdhury S.P., Dietel K.* Transposon mutagenesis of the plantassociated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and the *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe interactions // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – Art. 5.
16. *Burlak O.P., de Vera J.P., Yatsenko V., Kozyrovska N.O.* Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress // *Biopolym Cell.* – 2013. – Vol. 29. – P. 3–10.
17. *Cassells A.C.* Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture // *Plant tissue culture, development, and biotechnology.* – 2011. – Vol. 378. – P. 223–238.
18. *Chandra S., Bandopadhyay R., Kumar V., Chandra R.* Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land // *Biotechnol Lett.* – 2010. – Vol. 32. – P. 1199–1205
19. *Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens // *J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 140. – P. 27–37.
20. *Chowdhury S.P., Dietel K., Randler M.* Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – Art.7
21. *Compant S., Brader G., Muzammil S., Sessitsch A., Lebrihi A., Mathieu F.* Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases // *Biocontrol.* – 2013. – Vol. 58. – P. 435–455.
22. *de Almeida C.V., Andreote F.D., Yara R., Tanaka F.A.O., Azevedo J.L., de Almeida M.* Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2009. – Vol. 25. – P. 1757–1764.
23. *Debois D., Jourdan E., Smargiasso N.* Spatiotemporal monitoring of the anti-biome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging // *Analyt Chem.* – 2014. – Vol. 86. – P. 4431–4438.
24. *Dias A.C.F., Costa F.E.C. Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpcao L.C., Araujo W.L., Azevedo J.L., Melo I.S.* Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2009. – Vol. 25. – P. 189–195.



25. *Digat B., Brochard P., Hermelin V., Tozet M.* Interest of bacterized synthetic substrates MILCAP for in vitro culture // *Acta Hort.* – 1987. – Vol. 212. – P. 375 – 378.
26. *Doornbos R.F., van Loon L.C., Bakker P.A.* Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review // *Agron Sustain Dev.* – 2012. – Vol. 32. – P. 227–243.
27. *Dunaeva S., Osledkin Y.* Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role // *Agric Biol.* – 2015. – Vol. 50. – P. 3–15.
28. *Fernandez O., Theocharis A., Bordiec S., Feil R., Jacquens L., Clement C., Fontaine F., Ait Barka E.* Burkholderia phytofirmans PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism // *Mol Plant–Microbe Int.* – 2012.
29. *Fletcher J., Leach J.E., Eversole K., Tauxe R.* Human pathogens on plants: designing a multidisciplinary strategy for research // *Phytopathology.* – 2013. – Vol. 103. – P. 306–315.
30. *Giron D., Frago E., Glevarec G., Pieterse C.M.J., Dicke M.* Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence // *Funct Ecol.* – 2013. – Vol. 27. – P. 599–609.
31. *Goellner K., Conrath U.* Priming: it’s all the world to induced disease resistance // *Sustainable disease management in a European context.* – 2008. – P. 233–242.
32. *Gonzalez A.J., Larraburu E.E., Llorente B.E.* Azospirillum brasilense increased salt tolerance of jojoba during in vitro rooting // *Ind Crops Prod.* – 2015. – Vol. 76. – P. 41–48.
33. *Gopinath S., Kumaran K.S., Sundararaman M.* A new initiative in micropropagation: airborne bacterial volatiles modulate organogenesis and antioxidant activity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 51. – P. 514–523.
34. *Grover M., Ali S.Z., Sandhya V., Rasul A., Venkateswarlu B.* Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 1231–1240.
35. *Guglielmetti S., Basilio R., Taverniti V., Arioli S., Piagnani C., Bernacchi A.* Luteibacter rhizovicius MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 29. – P. 2025–2032.
36. *Herman E.* Toward control of micropropagation contamination // *Agricell Rep.* – 1987. – Vol. 2129. – P. 33–35.
37. *Herzner A.M., Dischinger J., Szekat C.* Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – Art. e22389
38. *Idris E.E.S., Iglesias D.J., Talon M.* Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2007. – Vol. 20. – P. 619–626.



39. Kaluzna M., Mikicinsk A., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkteleer E., Orlikowska T. Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures // *Acta Agrobot.* – 2013. – Vol. 66. – P. 81–92
40. Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Mafei M.E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity // *Front Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – Art. 151.
41. Krober M., Wibberg D., Grosch R. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 252.
42. Lata H., Li X.C., Silva B., Moraes R.M., Halda-Alija L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2006. – Vol. 85. – P. 353–359.
43. Liu Z., Budiharjo A., Wang P. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97 – Art. 10081–90.
44. Lucero M.E., Unc A., Cooke P., Dowd S., Sun S. Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var *griithsii* // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – Art. e17693.
45. Ludwig-Muller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? // *Biotechnol Lett.* – 2015. – Vol. 37. – P. 1325–1334.
46. Ludwig-Muller J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense // *J Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 172. – P. 4–12.
47. Marino G., Altan A.D., Biavati B. The effect of bacterial contamination on the growth and gas evolution of in vitro cultured apricot shoots // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 1996. – Vol. 32. – P. 51–56.
48. Montanez A., Blanco A.R., Barlocco C., Beracochea M., Sicardi M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro // *Appl Soil Ecol.* – 2012. – Vol. 58. – P. 21–28.
49. Naveed M., Mitter B., Reichenauer T.G., Wiczorek K., Sessitsch A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17 // *Environ Exp Bot.* – 2014. – Vol. 97. – P. 30–39.
50. Norman D.J., Alvarez A.M. Latent infections of in vitro anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Diefenbachiae* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1994. – Vol. 39. – P. 55–61.
51. Nowak J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 1998. – Vol. 34. – P. 122–130.
52. Nowak J., Bensalim S., Smith C.D., Dunbar C., Asiedu S.K., Madani A., Lazarovits G., Northcott D., Sturz A.V. Behaviour of plant material issued from in vitro tuberization // *Potato Res.* – 1999. – Vol. 42. – P. 505–519.



53. *Orlikowska T., Nowak K., Reed B.* Bacteria in the plant tissue culture environment // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2017. – Vol. 128. – P. 487–508.
54. *Owen D., Williams A.P., Griith G.W., Withers P.J.A.* Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition // *Appl Soil Ecol.* – 2015. – Vol. 86. – P. 41–54.
55. *Pacurar D.I., Thordal-Christensen H., Pacurar M.L., Pamil D., Botez C., Bellini C.* *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation // *Physiol Mol Plant Pathol.* – 2011. – Vol. 76. – P. 76–81.
56. *Panigrahi S., Aruna Lakshmi K., Venkateshwarulu Y., Umesh N.* Biohardening of micropropagated plants with PGPR and endophytic bacteria enhances the protein content // *Biotechnology and bioforensics, forensic and medical bioinformatics.* – 2015. – P. 51–55.
57. *Patten C.L., Glick B.R.* Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – Vol. 68 – P. 3795–3801.
58. *Pischke M.S., Huttlin E.L., Hegeman A.D., Sussman M.R.* A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 140. – P. 1255–1278.
59. *Poppenberger B., Leonhardt W., Redl H.* Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in micropropagated *Vitis vinifera* // *VITIS-J Grapevine Res.* – 2002. – Vol. 41. – P. 113–114.
60. *Quambusch M., Pirttila A.M., Tejesvi M.V., Winkelmann T., Bartsch M.* Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes // *Tree Physiol.* – 2014. – Vol. 34. – P. 524–533.
61. *Raaijmakers J., De Bruin I., Nybroe O.* Natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // *FEMS Microbiol Rev.* – 2010. – Vol. 34. – P. 1037–1062.
62. *Rakotoniriana E.F., Rafamantanana M.* Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica* on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2013. – Vol. 103. – P. 121–133.
63. *Reed B.M., Mentzer J., Tanprasert P., Yu X.* Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment // *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation.* – 1997. – P. 233–236.
64. *Rolli E., Marasco R., Viganì G., Ettoumi B., Mapelli F.* Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait // *Environ Microbiol.* – 2015. – Vol. 17. – P. 316–331.
65. *Saravanakumar D.* Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration // *Bacteria in agrobiolgy: stress management.* – 2012. – P. 187–210.
66. *Scherling C., Ulrich K., Ewald D., Weckwerth W.* A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics // *Mol Plant–Microbe Interact MPMI.* – 2009. – Vol. 22. – P. 1032–1037.



67. Scholz R., Vater J., Budiharjo A. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // *J Bacteriol.* – 2014. – Vol. 196. – P. 1842–1852.
68. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Vasylieva N.Y. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea // *Microbiological journal.* . – 2020. – Vol. 82 – № 3.
69. Suada E.P., Jasim B., Jimtha C.J., Gayatri G.P., Radhakrishnan E.K., Remakanthan A. Phytostimulatory and hardening periodreducing effects of plant-associated bacteria on micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 2014. – Vol. 51. – P. 682–687.
70. Sunayana M.R., Sasikala C., Ramana C.V. Rhodestrin: A novel indole terpenoid phytohormone from *Rhodobacter sphaeroides* // *Biotechnol Lett.* – 2005. – Vol. 27. – P. 1897–1900.
71. Talboys P.J., Owen D.W., Healey J.R. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum* // *BMC Plant Biol.* – 2014. – Vol. 14. – Art. 51.
72. Theocharis A., Bordiec S., Fernandez O., Paquis S., Dhondt-Cordelier S., Baillieul F., Clement C., Barka E.A. *Burkholderia* phytofirmans PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures // *Mol Plant–Microbe Interact MPMI.* – 2012. – Vol. 25. – P. 241–249.
73. Thomas J., Ajay D., Raj Kumar R., Mandal A.K.A. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2010. – Vol. 101. – P. 365–370.
74. Thomas P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte // *J Appl Microbiol.* – 2004. – Vol. 97. – P. 114–123.
75. Thomas P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed in vitro watermelon and their activation in degenerating cultures // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30. – P. 2313–2325.
76. Thomas P., Kumari S., Swarna G.K., Gowda T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo // *Can J Microbiol.* – 2007. – Vol. 53. – P. 380–390.
77. Tsao C.W., Postman J.D., Reed B.M. Virus infections reduce in vitro multiplication of “Malling Landmark” raspberry // *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 65–68.
78. Turner T.R., James E.K., Poole P.S. The plant microbiome // *Genome Biol.* – 2013. – Vol. 14. – Art. 209.
79. Ueno K., Cheplick S., Shetty K. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano // *Process Biochem.* – 1998. – Vol. 33. – P. 441–445.
80. Vacheron J., Desbrosses G., Boufaud M.L., Touraine B., Moenne Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dye F., Prigent-Combaret C. Plant



- growth-promoting rhizobacteria and root system functioning // *Front Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4. – Art. 356.
81. Vereecke D., Burssens S., Simon-Mateo C., Inze D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M. The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications // *Planta.* – 2000. – Vol. 210. – P. 241–251.
 82. Wang B., Mei C., Seiler J.R. Early growth promotion and leaf level physiology changes in *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN inoculated switchgrass // *Plant Physiol Biochem.* – 2015. – Vol. 86. – P. 16–23.
 83. Weilharter A., Mitter B., Shin M.V., Chain P.S.G., Nowak J., Sessitsch A. Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN // *J Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193. – P. 3383–3384.
 84. Xie X., Zhang H., Pare P.W. Sustained growth promotion in arabidopsis with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) // *Plant Signal Behav.* – 2009. – Vol. 4. – P. 948 – 953.
 85. Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I., Pieterse C.M.J. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria // *Plant Physiol.* – 2013. – Vol. 162. – P. 304–318.
 86. Zawadzka M., Trzcinski P., Nowak K., Orlikowska T. The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on in vitro multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants // *J Hortic Res.* – 2014. – Vol. 21. – Art. 41.
 87. Ziemienowicz A. Agrobacterium-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances // *Biocatal Agric Biotechnol.* – 2014. – Vol. 3. – P. 95–102.

References

1. Aballay E, Martensson A, Persson P. Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. *Plant Soil.* 2011;(347):313–325
2. Abreu-Tarazi MF, Navarrete AA, Andreote FD, Almeida CV, Tsai SM, Almeida M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; (26):555–560
3. Ali S, Duan J, Charles TC, Glick BR. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J Theor Biol.* 2014;(343):193–198
4. Andreote FD, da Rocha UN, Araujo WL, Azevedo JL, van Overbeek LS. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010;(97):389–399
5. Ardanov P, Ovcharenko L, Zaets I, Kozyrovska N, Pirttila A. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biol Control.* 2011;(56):43–49
6. Ardanov P, Sessitsch A, Haggman H, Kozyrovska N, Pirttila AM. Methylobacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. *PLoS ONE.* 2012; (7):46802



7. Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko EV, Melentiev AI, Kudoyarova GR. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil*. 2007;(292):305–315
8. Balla I, Vertesy J, Koves-Pechy K, Voros I, Bujtas Z, Biro B. Acclimation results of micropropagated black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by symbiotic micro-organisms. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1998;(52):113–115
9. Barka EA, Nowak J, Clement S. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growthpromoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl Env Microbiol*. 2006
10. Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*. 2014;(378):1–33
11. Bensalim S, Nowak J, Asiedu SK. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am J Potato Res*. 1998
12. Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growthpromoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. 2013;(2):883–898
13. Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and bio-control agents. *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*. 2011; 41 – 76
14. Bottini R, Cassan F, Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;(65):497–503
15. Budiharjo A, Chowdhury SP, Dietel K. Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and the *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe interactions. *PLoS One*. 2014;(9):5
16. Burlak OP, de Vera JP, Yatsenko V, Kozyrovska NO. Putative mechanisms of bacterial effects on plant photosystem under stress. *Biopolym Cell*. 2013;(29):3–10
17. Cassells AC. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. 2011;(378):223–238
18. Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett*. 2010;(32):1199–1205
19. Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol*. 2009;(140):27–37
20. Chowdhury SP, Dietel K, Randler M. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One*. 2013;(8):7
21. Compant S, Brader G, Muzammil S, Sessitsch A, Lebrhi A, Mathieu F. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Biocontrol*. 2013;(58):435–455



22. de Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL, de Almeida M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;(25):1757–1764
23. Debois D, Jourdan E, Smargiasso N. Spatiotemporal monitoring of the anti-biome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Analyt Chem.* 2014;(86):4431–4438
24. Dias ACF, Costa FEC, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpcao LC, Araujo WL, Azevedo JL, Melo IS. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;(25):189–195
25. Digat B, Brochard P, Hermelin V, Tozet M. Interest of bacterized synthetic substrates MILCAP for in vitro culture. *Acta Hort.* 1987;(212):375–378
26. Doornbos RF, van Loon LC, Bakker PA. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron Sustain Dev.* 2012;(32):227–243
27. Dunaeva S, Osledkin Y. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role. *Agric Biol.* 2015;(50):3–15
28. Fernandez O, Theocharis A, Bordiec S, Feil R, Jacquens L, Clement C, Fontaine F, Ait Barka E. *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Mol Plant–Microbe Int.* 2012.
29. Fletcher J, Leach JE, Eversole K, Tauxe R. Human pathogens on plants: designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology.* 2013;(103):306–315
30. Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ, Dicke M. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defense. *Funct Ecol.* 2013;(27):599–609
31. Goellner K, Conrath U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Sustainable disease management in a European context.* 2008;233–242
32. Gonzalez A.J., Larraburu E.E., Llorente B.E. *Azospirillum brasilense* increased salt tolerance of jojoba during in vitro rooting. *Ind Crops Prod.* 2015;(76):41–48
33. Gopinath S, Kumaran KS, Sundararaman M. A new initiative in micropropagation: airborne bacterial volatiles modulate organogenesis and antioxidant activity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2015;(51):514–523
34. Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011;(27):1231–1240
35. Guglielmetti S, Basilico R, Taverniti V, Arioli S, Piagnani C, Bernacchi A. *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;(29):2025–2032
36. Herman E. Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Rep.* 1987;(2129):33–35



37. Herzner AM, Dischinger J, Szekat C. Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One*. 2011;(6):e22389
38. Idris EES, Iglesias DJ, Talon M. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007;(20):619–626
39. Kaluzna M, Mikicinsk A, Sobiczewski P, Zawadzka M, Zenkteler E, Orlikowska T. Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures. *Acta Agrobot*. 2013;(66):81–92
40. Kanchiswamy CN, Malnoy M, Mafei ME. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci*. 2015;(6):151
41. Krober M, Wibberg D, Grosch R. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Front Microbiol*. 2014;(5):252
42. Lata H, Li XC, Silva B, Moraes RM, Halda-Alija L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2006;(85):353–359
43. Liu Z, Budiharjo A, Wang P. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *App Microbiol Biotechnol*. 2013;(97):10081–90
44. Lucero ME, Unc A, Cooke P, Dowd S, Sun S. Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var *griithsii*. *PLoS ONE*. 2011;(6):e17693
45. Ludwig-Muller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol Lett*. 2015;(37):1325–1334
46. Ludwig-Muller J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *J Plant Physiol*. 2015;(172):4–12
47. Marino G, Altan AD, Biavati B. The effect of bacterial contamination on the growth and gas evolution of in vitro cultured apricot shoots. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1996;(32):51–56
48. Montanez A, Blanco AR, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl Soil Ecol*. 2012;(58):21–28
49. Naveed M, Mitter B, Reichenauer TG, Wiczorek K, Sessitsch A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environ Exp Bot*. 2014;(97):30–39
50. Norman DJ, Alvarez AM. Latent infections of in vitro anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Diefenbachiae*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1994;(39):55–61
51. Nowak J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1998;(34):122–130.
52. Nowak J, Bensalim S, Smith CD, Dunbar C, Asiedu SK, Madani A, Laza-



- rovits G, Northcott D, Sturz AV. Behaviour of plant material issued from in vitro tuberization. *Potato Res.* 1999;(42):505–519
53. Orlikowska T, Nowak K, Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2017;(128):487–508
54. Owen D, Williams AP, Griith GW, Withers PJA. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Appl Soil Ecol.* 2015;(86):41–54
55. Pacurar DI, Thordal-Christensen H, Pacurar ML, Pamil D, Botez C, Bellini C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2011;(76):76–81
56. Panigrahi S, Aruna Lakshmi K, Venkateshwarulu Y, Umesh N. Biohardening of micropropagated plants with PGPR and endophytic bacteria enhances the protein content. *Biotechnology and bioforensics, forensic and medical bioinformatics.* 2015;51 – 55
57. Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 2002;(68):3795–3801
58. Pischke MS, Huttlin EL, Hegeman AD, Sussman MR. A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. *Plant Physiol.* 2006;(140):1255–1278
59. Poppenberger B, Leonhardt W, Redl H. Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in micropropagated *Vitis vinifera*. *VITIS-J Grapevine Res.* 2002;(41):113–114
60. Quambusch M, Pirttila AM, Tejesvi MV, Winkelmann T, Bartsch M. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiol.* 2014;(34):524–533
61. Raaijmakers J, De Bruin I, Nybroe O. Natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;(34):1037–1062
62. Rakotoniriana EF, Rafamantanana M. Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica* on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013;(103):121–133
63. Reed BM, Mentzer J, Tanprasert P, Yu X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation.* 1997;233–236
64. Rolli E, Marasco R, Vigani G, Ettoumi B, Mapelli F. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environ Microbiol.* 2015;(17):316–331
65. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. *Bacteria in agrobiolology: stress management.* 2012;187–210
66. Scherling C, Ulrich K, Ewald D, Weckwerth W. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Mol Plant–Microbe Interact MPMI.* 2009;(22):1032–1037



67. Scholz R, Vater J, Budiharjo A. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol.* 2014;(196):1842–1852
68. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Vasylieva NY. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea. *Microbiological journal.* 2020;(82):3
69. Suada EP, Jasim B, Jimtha CJ, Gayatri GP, Radhakrishnan EK, Remakanthan A. Phytostimulatory and hardening periodreducing effects of plant-associated bacteria on micropropagated *Musa acuminata* cv. Grand Naine. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2014;(51):682–687
70. Sunayana MR, Sasikala C, Ramana CV. Rhodestrin: A novel indole terpenoid phytohormone from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett.* 2005;(27):1897–1900
71. Talboys PJ, Owen DW, Healey JR. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol.* 2014;(14):51
72. Theocharis A, Bordiec S, Fernandez O, Paquis S, Dhondt-Cordelier S, Baillicul F, Clement C, Barka EA. Burkholderia phytofirmans PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures. *Mol Plant–Microbe Interact MPMI.* 2012;(25):241–249
73. Thomas J, Ajay D, Raj Kumar R, Mandal AKA. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;(101):365–370
74. Thomas P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *J Appl Microbiol.* 2004;(97):114–123
75. Thomas P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed in vitro watermelon and their activation in degenerating cultures. *Plant Cell Rep.* 2011;(30):2313–2325
76. Thomas P, Kumari S, Swarna GK, Gowda TKS. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. *Can J Microbiol.* 2007;(53):380–390
77. Tsao CW, Postman JD, Reed BM. Virus infections reduce in vitro multiplication of “Malling Landmark” raspberry. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2000;(36):65–68
78. Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biol.* 2013;(14):209
79. Ueno K, Cheplick S, Shetty K. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* spp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. *Process Biochem.* 1998;(33):441–445
80. Vacheron J, Desbrosses G, Boufaud ML, Touraine B, Moenne Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dye F, Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 2013;(4):356
81. Vereecke D, Burssens S, Simon-Mateo C, Inze D, Van Montagu M, Goethals K, Jaziri M. The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological



- traits and biotechnological applications. *Planta*. 2000;(210):241–251
82. Wang B, Mei C, Seiler JR. Early growth promotion and leaf level physiology changes in *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN inoculated switchgrass. *Plant Physiol Biochem*. 2015;(86):16–23
83. Weilharter A, Mitter B, Shin MV, Chain PSG, Nowak J, Sessitsch A. Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *J Bacteriol*. 2011;(193):3383–3384
84. Xie X, Zhang H, Pare PW. Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant Signal Behav*. 2009;(4):948–953
85. Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I, Pieterse CMJ. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. *Bacteria*. *Plant Physiol*. 2013;(162):304–318
86. Zawadzka M, Trzcinski P, Nowak K, Orlikowska T. The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on *in vitro* multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants. *J Hortic Res*. 2014;(21):41
87. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2014;(3):95–102

Стаття надійшла до редакції 13.10.2020 р.



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).219212](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).219212)

УДК 577.152.34/ 544.478.3

Є.А. Шестеренко, І.І. Романовська

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, (048)793-70-76,
e-mail: romairina@gmail.com

ОТРИМАННЯ S-ЕНАНТІОМЕРІВ ЕСТЕРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ

Мета: удосконалення способу отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині, доданої до агару. **Методи:** мікросомальну фракцію отримували низькошвидкісною седиментацією в присутності йонів кальцію, вміст білка визначали за методом Лоурі-Хартрі, естеразну активність за 1-нафтилацетатом. Одержання біокатализатора багаторазової дії проводили введенням мікросомальної фракції в гель агару. Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 год в розчині метилцелозоль/Na-фосфатний буфер, 0,0167 моль/дм³, рН 7,0 (2/3, об./об.), при температурі 37 °С. Визначення енантіомерного надлишку здійснювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. **Результати:** Удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Додавання мікросомальної фракції в гель агару сприяло розробці доступного методу отримання біокатализатора багаторазової дії з високою естеразною активністю (90%). Вибір метилцелозольву, як розчинника в реакції енантіоселективного гідролізу дозволив усунути чотири стадії біотехнології отримання S-енантіомеру субстрату. Проведено модифікацію носія для колонкової хроматографії, що дозволило візуалізувати процес розділення похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону під час хроматографії за допомогою УФ-опромінення. Змінено хроматографічну систему з хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) на хлороформ/ацетонітрил (3/0,5), що сприяло значному покращенню розділення похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону. **Висновки:** удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону, що дозволило спростити процес його виділення на 5 стадій.

Ключові слова: карбоксилестераза, мікросомальна фракція, естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, агар, енантіоселективний гідроліз, біотехнологія.



Карбоксилестераза печінки свині широко використовується для отримання енантіомерів лікарських речовин [19], асиметричний синтез і розділення яких звичайними хімічними і фізичними методами пов'язаний з низкою труднощів.

Карбоксилестераза має широку субстратну специфічність і високу енантіоселективність [12, 15], однак недоліками застосування ферменту є висока вартість комерційного препарату і одноразовість використання. У зв'язку з цим, актуальним є застосування карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції (МФ) печінки свині, а також розробка біокатализатора багаторазової дії на основі іммобілізованої мікросомальної фракції, для проведення енантіоселективного гідролізу естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону. Включення ензимів у полімери дозволяє стабілізувати активність біокатализатора, сприяє його багаторазовому використанню, легкості виділення з реакційного середовища [2, 18]. Для створення біокатализатора перспективне використання методу нековалентного зв'язування мікросомальної фракції шляхом включення в гель агару.

Агар-агар – природна суміш поліцукридів агарози і агаропектину, що отримують з водоростей видів *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia* та ін. [16]. Він широко використовується в харчовій промисловості, для отримання поживних середовищ, гель-електрофорезі. Агар відомий як перший отриманий з водоростей поліцукрид, що був застосований для іммобілізації білкових речовин [20]. Агар є перспективною матрицею для іммобілізації клітин і субклітинних фракцій, оскільки є доступним, економічним, нетоксичним [10, 14], має високу ємкість та є нерозчинним в більшості водно-органічних середовищ. В зв'язку з цим, актуальним було розробити спосіб іммобілізації мікросомальної фракції в агарі.

Раніше нами було отримано S-енантіомери естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою вільної та іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині [5, 6, 17]. З'ясовано, що одержані енантіомери мають в 1,5–2 рази більший афінитет до центральних бенздіазепінових рецепторів і протисудомну активність порівняно з відповідними рацематами. Це приводить до зменшення необхідної дози потенційного лікарського засобу зі збереженням фармакологічного ефекту [1].

Для подальшого вивчення фармакологічних властивостей необхідно отримання S-енантіомерів в препаративній кількості. Однак розроблений раніше спосіб отримання енантіомерів був багатостадійним [5]. Тому вкрай перспективною була модифікація способу одержання S-енантіомерів досліджуваних естерів на прикладі родоначальника ряду – 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Метою роботи було удосконалення способу отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині, включеної в агар.

Матеріали та методи

В роботі використовували печінку свині, придбану в місцевому супер-



маркеті. Агар, силікагель (0,063–0,200 мм), бичачий сироватковий альбумін, натрію додецилсульфат, 1-нафтилацетат, натрій фосфорнокислий однозаміщений, гідроксиламінігдрохлорид придбані в Sigma Chem. Co, (Німеччина). Інші реактиви аналітичного ступеню чистоти були отримані в ООО «ТОР».

Виділення мікросомальної фракції з печінки свині здійснювали низькошвидкісною седиментацією в присутності йонів Ca^{2+} [8,11]. У виділених мікросомах визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [9], естеразну активність (за стандартним субстратом 1-нафтилацетатом) [7,21].

Введення мікросомальної фракції печінки свині в агар проводили додаючи до 3,5% водного розчину агару необхідну кількість мікросомальної фракції [5]. Ретельно перемішували суміш, виливали на підложку і, після охолодження розрізали на однакові частини розміром 0,5×0,5 см; проводили стандартизацію препарату за вмістом білка та естеразною активністю. Зберігали при температурі 0–4 °С. Вплив рН інкубаційного середовища на карбоксилестеразну активність вільної і іммобілізованої мікросомальної фракції вивчали в середовищі: диметилсульфоксид (ДМСО)/К-фосфатний буферний розчин 2/3 при рН 3,5–9,5; $t = 37$ °С. Визначення температурного оптимуму карбоксилестеразної активності препаратів проводили в діапазоні 20–75 °С в умовах рН-оптимуму ензиму. Ступінь гідролізу 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону оцінювали за зменшенням кількості естерних груп гідроксаматним методом спектрофотометрично при λ 540 нм [7,13].

Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 год в розчині диметилсульфоксид/К-фосфатний буферний розчин (0,0167 моль/дм³, рН 7,0) в об'ємних співвідношеннях 2/3, при температурі 37 °С до 50% трансформації естеру.

Виділення *S*-енантіомеру естеру 3-гідрокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону з реакційного середовища проводили після енантіоселективного гідролізу екстракцією продуктів реакції хлороформом. Далі упарювання і розділення методом колонкової хроматографії (носії: силікагель (0,063–0,200 мм), модифікований люмінофором: ортосилікатом цинку з хлоридом марганцю) з використанням системи хлороформ/ацетонітрил (3/0,5). Перекристалізовували з етилацетату. Визначення енантіомерного надлишку за допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) проводили, застосовуючи систему SHIMADZU (контроллер системи CBM-20A; вакуумний дегазатор DGU-20 A5; насос високого тиску LC 20 AD UFLS, оснащений 4-канальним градієнтним блоком низького тиску; термостат колонок СТО-20A; діодно-матричний детектор SPDМ20A), що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 μ m (4мм×250мм). Використовували систему метанол/вода (70/30, об./об.) та швидкості потоку 1 см³/хв. Час утримання піків в рацематі субстрату складав 5,3 хв – 49,93% для *R*-енантіомеру і 7,8 хв – 50,07% – *S*-енантіомеру. Час утримання піків в отриманому енантіомері субстрату складав 5,3 хв – 1,2% для *R*-енантіомеру і 7,8 хв – 98,8% – *S*-енантіомеру.

Отримання люмінофору проводили додаючи 3,635 г хлориду марганцю, розчиненого у дистильованій воді, до 50 г ортосилікату цинку. Перемішували при кімнатній температурі до утворення гомогенної маси, а потім висушували



при 120 °С до постійної маси. При 950 °С проводили спікання в муфельній печі в інертній атмосфері протягом 2 год [3]. Модифікація силікату цинку йонами марганцю приводить до утворення люмінофора із спектром випромінювання 230–290 нм. Далі до 50 г силікагелю (0,063–0,200 мм) додавали 1,25 г люмінофору, змішували й поміщали в кварцову колонку.

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню згідно [4]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень при кількості повторі $n=5$. Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати та обговорення

З печінки свині методом низькошвидкісної седиментації в присутності йонів Ca^{2+} виділена мікросомальна фракція з виходом білка $38,0 \pm 1,5$ мг/г тканини, естеразною активністю за 1-нафтилацетатом – $17,25 \pm 0,6$ мкмоль/мг білка за хв.

Раніше нами було проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою мікросомальної фракції печінки свині (рис.1) і розроблено схему отримання і виділення S-енантіомера субстрату (рис. 2), яка включає 14 стадій [5,6,17].

Для удосконалення багатостадійного процесу отримання енантіомеру і можливості багаторазового використання біокаталізатора нами були внесені зміни до наявного способу.

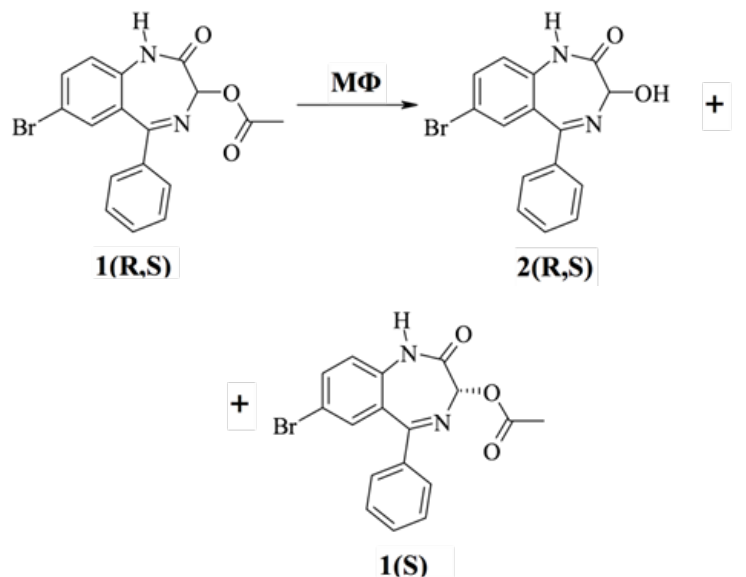


Рис. 1. Енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону: (R,S) – рацемат, (S) – S-енантіомер

Fig. 1. Enantioselective hydrolysis of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one : (R, S) - racemate, (S) - S-enantiomer



Рис. 2. Схема отримання S-енантіомера 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону

Fig. 2. Scheme of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one



Використання агару для включення мікросомальної фракції

Вибір агару як матриці для іммобілізації обґрунтовано рядом переваг. По-перше, простою методу отримання біокатализатора, що не потребує додаткового обладнання для приготування гранул, на відміну від іммобілізації в каррагінан і альгінат натрію. По-друге, більшим збереженням естеразної активності мікросомальної фракції після іммобілізації (90,3%) порівняно з такою в гранулах альгінату натрію (69,6%) і карагінану (80,4%), а також можливістю включення більшої кількості мікросомальної фракції в носій, про що свідчать масові відношення білок/носії. Характеристики іммобілізованих препаратів мікросомальної фракції наведені в таблиці 1.

Ефективність іммобілізації підтверджена розширенням рН-оптимуму естеразної активності іммобілізованого продукту порівняно з вільним (рН 7,0) в області як кислих, так і лужних значень (рН 6,0–8,0).

Таблиця 1

Порівняльні характеристики мікросомальної фракції, іммобілізованої в полімерних носіях

Table 1

Comparative characteristics of the microsomal fraction, immobilized in polymeric carriers

Показники	Агар	Карагінан*	Альгінат*
Масове відношення білок/носії	1/1,5	1/5	1/4
Естеразна активність, % від вихідної *	90,3	80,4	69,6
Вміст води, %	79,5± 4,61 P**<0,05	85,5± 4,6 P**<0,05	84,6 ± 4,6 P**<0,05
рН-оптимум	6,0-8,0	7,0	7,0
Термооптимум, °С	40	40	40
Зберігання (0-4°С), міс	6	9	6

Примітка. *Вихідна активність вільної фракції – 17,25 мкмоль/мг білку за хв [5,6]. **Ймовірність відмінностей визначення вмісту води між препаратами на основі агару, карагінану і альгінату (n = 5).

Note. *The initial activity of the free fraction – 17,25 μmole/ mg protein per minute [5,6]. **The probability of differences between preparations based on agar, carrageenan and alginate (n = 5)

За допомогою іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Отримано енантіомер **1 (S)**, встановлено питоме обертання $[\alpha]_D^{20} = +116,9^\circ$ (c=1 в хлороформі); енантіомерний надлишок склав $e_e > 97\%$.

Показано, що іммобілізована в агарі мікросомальна фракція каталізує енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-



бенздіазепін-2-ону з 50% ступенем трансформації впродовж 5 циклів використання в періодичному режимі (рис. 3)

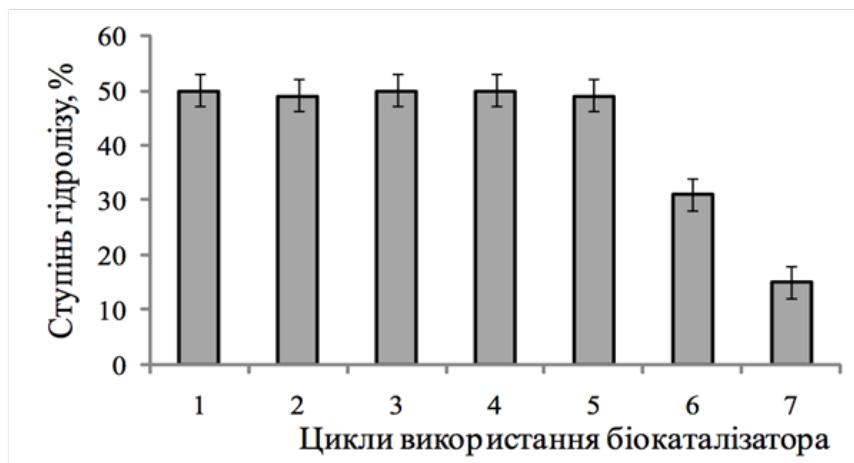


Рис. 3. Цикли застосування біокатализатора багаторазового використання для енантіоселективного гідролізу субстрату 1 (n = 5)

Fig. 3. Cycles of reusable biocatalyst application for enantioselective hydrolysis of substrate 1 (n = 5)

Заміна розчинника в реакції гідролізу субстрату

Естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону погано розчинні у воді, тому процес гідролізу проводили у водно-органічному середовищі ДМСО/Na-фосфатний буферний розчин (0,1 моль/см³, рН 7,0).

Проте ДМСО, як розчинник, заважає виділенню продуктів з реакційної суміші через високу температуру кипіння і потребує додаткових стадій очищення продуктів реакції після екстракції з реакційної суміші (дворазове промивання водою і центрифугування) [6]. Для зменшення стадійності процесу було вивчено вплив розчинників ацетонітрилу, метилцелозольву, 1,4-діоксану на ступінь гідролізу естеру **1** іммобілізованим препаратом порівняно з ДМСО. Концентрації розчинників у водно-органічному середовищі реакції склали: ДМСО, ацетонітрил, метилцелозольв – 40%, 1,4-діоксан – 50%.

Показано, що ступінь гідролізу сполуки **1** у разі застосування ДМСО і метилцелозольву становить 50%, тоді як використання 1,4-діоксану і ацетонітрилу призводить до її значного зниження (рис. 4).

Таким чином, найбільш придатним з досліджуваних розчинників для здійснення енантіоселективного гідролізу сполуки **1** іммобілізованим препаратом був метилцелозольв, що сприяє усуненню чотирьох стадій процесу.

Модифікація носія для колонкової хроматографії

Можливість детектування речовин за допомогою УФ-опромінення безпосередньо у колонці дозволяє спростити процес хроматографії шляхом візуального контролю за розділенням речовин.



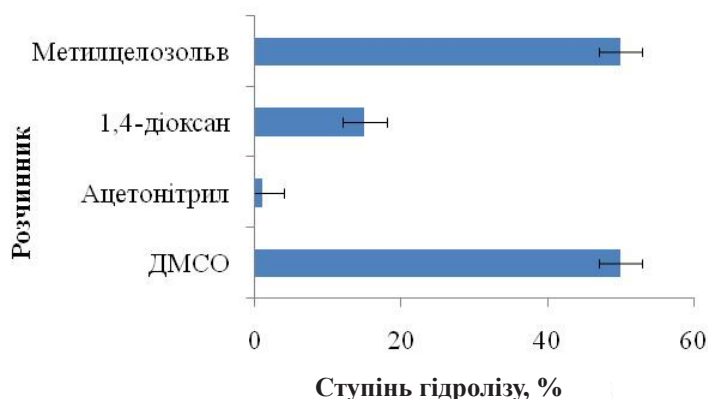


Рис. 4. Вплив розчинників на ступінь енантіоселективного гідролізу естеру 1 (n = 5, p <0,05)

Fig. 4. The effect of solvents on the enantioselective hydrolysis degree of ester 1 (n = 5, p <0,05)

Проте, наявні комерційні носії для хроматографії з флуоресцентним індикатором вкрай дорогі, тому перспективним було розробити спосіб отримання доступного флуоресцентного носія.

Відомо, що модифікація силікату цинку іонами марганцю приводить до утворення люмінофора із спектром поглинання 230-290 нм [3].

Оскільки в УФ-спектрах похідних 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону є три смуги поглинання: 215, 220-240 і 290-330 нм, спектр поглинання даного люмінофору підходить для отримання необхідного хроматографічного носія. Показано, що додавання 2,5% ортосилікату цинку, модифікованого йонами марганцю до силікагелю (0,063–0,200 мм) достатньо для отримання носія з флуоресцентним індикатором.

Для візуалізації розділення досліджуваних похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону використовували кварцеву колонку і УФ-опромінення. Це дозволило відмовитися від використання стадії детекції продуктів гідролізу методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Заміна елюенту в колонковій хроматографії

Для покращення розділення досліджуваних сполук у колонці з флуоресцентним носієм під УФ-опроміненням, було замінено елюент хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) [5,6] на хлороформ/ацетонітрил (3/0,5). Використання обраного елюенту привело до кращого розділення досліджуваних похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону. Різниця в значеннях R_f між вивчаємими естером і 3-гідроксипохідним у системи хлороформ/1,4-діоксан/гептан (2/0,5/2) складала 1,16, а в системі хлороформ/ацетонітрил (3/0,5) різниця R_f становила 1,45. Отже, модифікована схема отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону виглядає таким чином (рис. 5):



Рис. 5. Модифікована схема отримання S-енантіомера 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону

Fig. 5. Modified scheme for obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one

Таким чином, удосконалено спосіб отримання S-енантіомеру 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону зменшенням кількості стадій процесу завдяки заміні розчинника естеру **1**, модифікації носія і заміні елюенту для колонкової хроматографії. Отриманий біокаталізатор – мікосомальна фракція, іммобілізована в агарі, дозволяє проводити енантіоселективний гідроліз протягом 5 циклів в періодичному режимі з кількісним збереженням естеразної активності.



Ye.A. Shesterenko, I.I. Romanovska

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorfska str. 86, Odessa, Ukraine, (048)7659431, e-mail: romairina@gmail.com

PREPARATION OF S-ENANTIOMERS OF 3-HYDROXY-1,4-BENZDIAZEPIN-2-ONE ESTERS BY BIOTECHNOLOGICAL WAY

Summary

Aim. Improving the method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one using microsomal fraction carboxylesterase included in agar. **Methods.** The microsomal fraction was obtained by low-speed sedimentation in the presence of calcium ions, the protein content was determined by the Lowry-Hartree method and esterase activity - according to 1-naphthyl acetate. Obtaining a reusable biocatalyst was performed by including the microsomal fraction in agar gel. Enzymatic hydrolysis of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one was performed for 2.5 h in a solution of methyl cellosolve: Na-phosphate buffer, 0.0167 M, pH 7.0 (2/3, vol./vol.), at a temperature of 37 °C. Enantiomeric excess was determined by HPLC. **Results.** The method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one was improved. The inclusion of the microsomal fraction in the agar gel contributed to the development of an available method for obtaining a biocatalyst of multiple actions with high esterase activity (90%). The choice of methylcelosolve as a solvent in the enantioselective hydrolysis reaction made it possible to eliminate four stages of biotechnology for obtaining the S-enantiomer of the substrate. A modification of the carrier for column chromatography was performed. It allowed to visualize the process of separation of 1,4-benzdiazepin-2-one derivatives during chromatography using UV-irradiation. Chromatography system was changed from chloroform: 1,4-dioxane: heptane (2: 0.5: 2) to chloroform: acetonitrile (3: 0.5). This resulted in significantly better separation of 1,4-benzdiazepin-2-one derivatives. **Conclusion.** The method of obtaining the S-enantiomer of 3-acetoxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepin-2-one has been improved, which made it possible to simplify the process of its isolation by 5 stages.

Key words: carboxylesterase, microsomal fraction, esters of 3-hydroxy-1,4-benzdiazepin-2-one, agar, enantioselective hydrolysis, biotechnology.



Е.А. Шестеренко, И.И. Романовская

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина, (048) 7659431, e-mail: romairina@gmail.com

ПОЛУЧЕНИЕ S-ЭНАНТИОМЕРОВ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ 3-ГИДРОКСИ-1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА-2-ОНА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ**Резюме**

Цель. Усовершенствование способа получения S-энантиомера 3-ацетокси-5-фенил-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи включенной в агар. **Методы.** Микросомальную фракцию получали низкоскоростной седиментацией в присутствии ионов кальция, содержание белка определяли по методу Лоури-Хартри, эстеразную активность – по 1-нафтилацетату. Получение биокатализатора многократного действия проводили включением микросомальной фракции в гель агара. Ферментативный гидролиз 3-ацетокси-5-фенил-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она проводили в течение 2,5 ч в растворе метилцелозольв/Na-фосфатный буфер, 0,0167 моль/дм³ рН 7,0 (2/3, об./об.), при температуре 37 °С. Определение энантиомерного избытка осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя систему SHIMADZU, оснащённую колонкой ChiraDex HR 5µm (4mm×250mm). **Результаты.** С использованием 3-ацетокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она усовершенствован способ получения его S-энантиомера. Включение микросомальной фракции в гель агара способствовало разработке доступного метода получения биокатализатора многократного действия с высокой эстеразной активностью (90%). Выбор метилцелозольва, как растворителя в реакции энантиоселективного гидролиза позволил устранить четыре стадии биотехнологии получения S-энантиомера субстрата. Проведена модификация носителя для колоночной хроматографии, что позволило визуализировать процесс разделения производных 1,4-бензодиазепин-2-она при хроматографии с помощью УФ-облучения. Заменена хроматографическая система с хлороформ/1,4-диоксан/гептан (2/0,5/2) на хлороформ/ацетонитрил (3/0,5), что привело к значительному улучшению разделения производных 1,4-бензодиазепин-2-она. **Выводы.** Усовершенствован способ получения S-энантиомера 3-ацетокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она, что позволило упростить процесс его выделения на 5 стадий.

Ключевые слова: карбоксилэстераза, микросомальная фракция, сложные эфиры 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она, агар, энантиоселективный гидролиз, биотехнология.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Василенко І.А., Лебедева М.В., Листров В.А.* Оптические изомеры в фармацевтике // Испытание и разработка лекарственных средств. – 2015. – Т. 10. – С. 92–104.
2. Имобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 216 с.
3. *Казанкин О.Н., Марковский Л.Я., Миронов И.А. и др.* Неорганические люминофоры. – Л.: Химия, 1975. – 192 с.
4. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К. Морион, 2000. – 320 с.
5. Пат. 76777 Україна. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону. Шестеренко Є.А., Романовська І.І., Севастьянов О.В., Павловський В.І., Андронаті С.А. Опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1.
6. Пат. 143009 Україна. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону. Шестеренко Є.А., Романовська І.І., Севастьянов О.В., Павловський В.І., Андронаті С.А. Опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13.
7. *Balls A.K., Wood H.N.* Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // J. Biol. Chem. – 1956. – V. 219, № 1. – P. 245–256.
8. *Eriksson L.S.* Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // Biochim. et Biophys. Acta. – 1978. – V. 508, № 1. – P. 155–164.
9. *Hartree E.F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 1. – P. 422–427.
10. *Kalita T., Sangma S., Bez G., Ambasht P.* Immobilization of acid phosphatase in agar-agar and gelatin: comparative characterization // Journal of Scientific Research. – 2020. – V. 64, № 2. – P. 192–200.
11. *Kamath S.A., Narayan K.A.* Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 1. – P. 53–61.
12. *Laizure C., Herring V., Hu Z. et al.* The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? // Pharmacotherapy. – 2013. – V. 33. – № 2. – P. 210–222.
13. *Mohie M.K., Sharaf E.D., Khalid A.M. et al.* Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations // Spectrochimica Acta Part A. – 2010. – V. 76, № 3–4. – P. 423–428.
14. *Pervez S., Nawaz M.A., Jamal M., Jan T. et al.* Improvement of catalytic properties of starch hydrolyzing fungal amyloglucosidase: utilization of agar-agar as an organic matrix for immobilization // Carbohydrate Research. – 2019. – V. 486. – 107860.
15. *Romano D., Bonomi F., Carlos de Mattos M. et al.* Esterases as stereoselective biocatalysts // Biotechnol Adv. – 2015. – V. 33. – № 5. – P. 547–565.
16. *Sattar H., Aman A.S.A., Qader U.* Agar-agar immobilization: An alternative



- approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 111. – P. 917–922.
16. *Shesterenko Ye.A., Romanovska I.I., Sevastyanov O.V. et al.* Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* – 2014. – V. 102. – P. 27–33.
 17. *Trelles J.A., Rivero C.W., Guisan J.M. et al.* Immobilization of enzymes and cells. Whole cell entrapment techniques. – NY.: Springer US, 2020. – P. 385–394.
 18. *Wang D., Zou L., Jin Q. et al.* Human Carboxylesterases: A Comprehensive review // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2018. – V. 8. – №. 5. – P. 699–712.
 19. *Williams P.W.; Phillips G.O.* Agar is made from seaweed and it is attracted to bacteria. "Chapter 2: Agar". *Handbook of hydrocolloids.* – Cambridge: Woodhead. – 2000. – 91 p.
 20. *Zhu K.Y., He F.* Elevated esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, *schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) // *Pesticide Biochem. Physiol.* – 2000. – V. 67, № 3. – P. 155–167.

References

1. Vasilenko IA, Lebedeva MV, Listrov VA. Optical isomers in pharmaceuticals. *Razrobotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2015; 10: 92-104. [In Russian].
2. J. Woodward. Immobilized cells and enzymes. **Moscow:** Mir, 1988, 216. [In Russian].
3. Kazankin ON, Markovskiy LY, Mironov IA et al. *Inorganic luminophore.* L.: Khimiya, 1975. 192. [In Russian].
4. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. *Statistical methods in biomedical research using Excel.* K.: Morion, 2000. 320 p. [in Russian].
5. Pat. 76777 Ukraine. The method of obtaining S-enantiomers of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Pavlovsky VI, Andronati SA. Publ. 10.01.2013. [In Ukrainian].
6. Pat. 143009 Ukraine. The method of obtaining S-enantiomers of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Pavlovsky VI, Andronati SA. Publ. 10.07.2020. [In Ukrainian].
7. Balls AK. Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol. *J. Biol. Chem.* 1956; 219(1): 245-256.
8. Eriksson LS. Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1978; 508(1): 155-164.
9. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; 48(1): 422-427.
10. Kalita T, Sangma SD, Bez G, Ambasht PK. Immobilization of Acid Phos-



- phatase in Agar-agar and Gelatin: Comparative Characterization. *Journal of Scientific Research*. 2020; 64(2): 192-200.
11. Kamath SA, Narayan KA. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Anal. Biochem*. 1972; 48(1): 53-61.
 12. Laizure C, Herring V, Hu Z. et al. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*. 2013; 33(2): 210-222.
 13. Mohie MK, Sharaf ED, Khalid AM et al. Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A*. 2010; 76(3-4): 423-428.
 14. Pervez S, Nawaz MA, Jamal M, Jan T et al. Improvement of catalytic properties of starch hydrolyzing fungal amyloglucosidase: Utilization of agar-agar as an organic matrix for immobilization *Carbohydrate Research*. 2019; 486:107860.
 15. Romano D, Bonomi F, Carlos de Mattos M et al. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(5): 547-565.
 16. Sattar H, Aman ASA, Qader U. Agar-agar immobilization: An alternative approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency. *Int J Biol Macromol*. 2018; 111: 917-922.
 17. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV et al. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes. *J. Mol. Catal. B. Enzym*. 2014; 102: 27-33.
 18. Trelles JA, Rivero CW, Guisan JM et al. Immobilization of enzymes and cells. Whole cell entrapment techniques. NY.: Springer US, 2020; 385-394.
 19. Wang D, Zou L, Jin Q et al. Human Carboxylesterases: A Comprehensive review. *Acta Pharm. Sin. B*. 2018; 8(5): 699-712.
 20. Williams PW, Phillips GO. Agar is made from seaweed and it is attracted to bacteria. "Chapter 2: Agar". *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead. 2000; 91.
 21. Zhu KY, He F. Elevated Esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Biochem. Physiol*. 2000; 67(3) 155-167.

Стаття надійшла до редакції 16.11.2020 р.



UDC 579.252.2:579.252.5

**В.О. Іваниця, М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук,
Н.Ю. Васильєва, Й. Калиновський**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: shtenikovnik@gmail.com

СІКВЕНС ГЕНОМУ *BACILLUS PUMILUS* ONU 554, ІЗОЛЬОВАНОГО З ГЛИБОКОВОДНИХ ДОННИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ

Метою роботи було проаналізувати структуру геному бактерій штаму *Bacillus* sp. ONU 554, ізолюваного з донних осадів Чорного моря, для його ідентифікації та виявлення генів, що відповідають за синтез біологічно активних сполук. **Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були структура та характеристика геному антагоністично активних бактерій штаму *Bacillus pumilus* ONU 554. Геному ДНК було секвеновано з використанням секвенатора HiSeq 1500 (Illumina). Збирання геному виконано з використанням асемблера Newbler версії 2.8, визначення видової приналежності штаму - за допомогою сервера TYGS, підрахунок ANI - з використанням Ezbiocloud. Анотування геному здійснили за допомогою серверів PATRIC та NCBI PGAP, пошук кластерів біосинтезу антибіотиків та бактеріоцинів - за допомогою antiSMASH та Bagel4, відповідно. Пошук детермінант патогенності виконувався за допомогою IslandViewer, резистентності до антибіотиків - ResFinder-3.2, пошук профагових елементів з використанням PHASTER. **Результати.** За даними повногеномного порівняння та 16S рРНК *Bacillus* sp. ONU 554 було ідентифіковано як *Bacillus pumilus* ONU 554. Його геном має розмір 3 642 544 п.о., який менший за геном типового штаму на 90 кб за рахунок ряду делецій. Виявлено плазмиду, чотири профагових елементи, один з яких на плазміді та 14 біосинтетичних кластерів, з яких три належать бактеріоцинам. **Висновки.** Таким чином, можна стверджувати, що дані повногеномного секвенування є більш надійним інструментом видової ідентифікації ніж аналіз тотального жирно кислотного профілю, а штаму, геном якого проаналізовано, може стати об'єктом для подальшої молекулярно-біотехнологічної роботи з вивчення та гетерологічної експресії виявлених кластерів.

Ключові слова: *Bacillus pumilus*, анотація геному, морські бактерії, донні відкладення, Чорне море, бактеріоцини, антимікробні сполуки.

Геноміка стала важливим напрямком біологічних досліджень, а її дані впливають на розвиток більш класичних галузей біології, таких, як теорія еволюції, біологія індивідуального розвитку, екологія тощо; також геноміка стає все більш важливою для прикладного знання, в першу чергу біотехнології [12, 13].

Розвиток геноміки неможливий без накопичення геномних даних – зокрема, власне секвенованих геномів у систематизованій формі, та їх анотацій.

© В.О. Іваниця, М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук, Н.Ю. Васильєва, Й. Калиновський, 2020



Рід *Bacillus* є цікавим об'єктом досліджень через поєднання таких рис, як велика таксономічна та біологічна різноманітність видів, які до нього належать та надзвичайно нерівномірну їх вивченість [15]. Остання проявлена, в тому числі, в кількості опублікованих геномів. Так, для типового виду роду і активного продуцента антибіотиків *B. subtilis* у базі даних GenBank на цей час опубліковано 170 повних геномів, небезпечного патогену *B. anthracis* – 62, перспективного для агропромисловості фітосимбіонту *B. velezensis* 146, відповідно. Натомість, такий вид, як *B. pumilus*, що належить до найдавніших з описаних видів цього роду, у тій самій базі даних представлено лише 14 зібраними геномами, враховуючи той, що представлено за результатами даної роботи. Брак геномів, придатних для порівняльного аналізу, ускладнює або навіть робить неможливим проведення узагальнюючих досліджень щодо геноміки окремих груп мікроорганізмів. Така ситуація не може бути названа задовільною, як через високий біосинтетичний потенціал даного виду (зокрема, здатність до біосинтезу специфічних антибіотиків гібридної нерибосомної пептидно-полікетидної природи – амікумацинів [19]), так і в контексті такого, що поступово формується, уявлення про значущість бактерій даного виду як фіто- та ентопатогенів [8, 11].

У ході наших попередніх досліджень з глибини 1888 м в точці з координатами 44° 37.243'N 35° 42.286'E отримано ізолят грампозитивних бактерій *Bacillus* sp. ONU 554, який виявляє антагоністичну активність до цілого ряду умовно-патогенних мікроорганізмів та синтезує широкий спектр позаклітинних гідролітичних ферментів [18]. За спектром жирних кислот його віднесено до виду *B. megaterium* [1]. Наявність вираженої антагоністичної активності по відношенню до ряду збудників опортуністичних інфекцій людини і тварин у поєднанні з високою біосинтетичною активністю, виявленою за допомогою рідинної хроматографії-мас-спектрометрії, стали мотивацією для проведення повногеномного секвенування цього штаму.

Метою даної роботи було проаналізувати структуру геному бактерій штаму *Bacillus* sp. ONU 554, ізольованого з донних осадів Чорного моря, для його ідентифікації та виявлення генів, що відповідають за синтез біологічно активних сполук. Для вирішення цього завдання вибрано геномний майнінг, який є ефективним засобом скрінингу продуцентів потенційних біологічно-активних метаболітів, оскільки він дозволяє виявити, окрім інших, генетичні кластери, що не експресуються за лабораторних умов з тих чи інших причин [25].

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були структура та характеристики геному бактерій штаму *Bacillus* sp. ONU 554, ізольованого із донних осадів шельфу Чорного моря з глибини 1888 м та ідентифікованого за спектром жирних кислот до виду *B. megaterium*. Виділення ДНК здійснювали за модифікованим методом [7]. Секвенування ДНК виконано в Інституті фармацевтичних досліджень Гельмгольца землі Саар (Федеративна Республіка Німеччина). Отриману геномну ДНК секвенувано з використанням двох бібліотек з короткою та довгою вставкою на приладі HiSeq 1500 (Illumina). Збирання рідів *de novo* ви-



конана з використання асемблера Newbler (версія 2.8). Для визначення виду на основі даних гену 16S РНК та повногеномного порівняння використовували інструмент TYGS [16]. Обрахування OrthoANI виконували за допомогою Ezbiocloud [23]. Анотування геному виконували за допомогою серверів PATRIC[22], порівняльний аналіз - за допомогою SEED[17]. За результатами PATRIC також побудована карта геному засобами даного серверу.

Пошук кластерів біосинтезу антибіотиків та бактеріоцинів виконували за допомогою antiSMASH 5.0 [5] та Vage I4 [20], відповідно, детермінант патогенності - за допомогою IslandViewer [4] та VirulenceFinder 2.0 [9], для пошуку детермінант резистентності використано ResFinder [24], профагових елементів – FASTER [1].

Результати та обговорення

Проведені дослідження встановили, що показник dDDH порівняння штаму *Bacillus* sp. ONU 554 з типовим штамом виду *Bacillus pumilus* NCTC 10337 складає лише 64,5%, що менше за критерій у 70% [2]. Різниця ГЦ-вмісту становить 0,22, що значно перевищує критичний показник видового розмежування. Значення критерію OrthoANI сягає 95,68%, що вище за дефінітивний критерій 95% [14]. Отже, за наведеними результатами обрахування індексів повногеномної подібності досліджуваній штам можна ідентифікувати як *Bacillus pumilus* ONU 554.

Геном *Bacillus pumilus* ONU 554 сягає 3642544 пар основ, що на 96,9 кб менше за геном типового штаму. Дана різниця може бути пояснена наявністю в геномі типового штаму *Bacillus pumilus* SH-B9 наступних інсерцій у порівнянні з геномом *Bacillus* sp. ONU 554: 331019-345833 п.о. (14,8 кб), 548738-579024 п.о. (30,2 кб), 1223547-1231981 п.о. (8,4 кб), 2509952-2550934 п.о. (40,1 кб), 2835168-2838616 п.о. (3,4 кб). Певний надлишок відносно зкомпенсовано невеликими інерціями: 854620-862290 п.о. (7,7 кб), 1681273-1686993 п.о. (5,7 кб), 3366808-3376515 п.о. (9,7 кб). Важливою особливістю геному *Bacillus* sp. ONU 554 є наявність у його складі відносно великої плазмиди, яка гомологічна плазміді штаму *Bacillus pumilus* SH-B9.

Базові геномні характеристики наведено у таблиці 1, візуалізація геномної анотації – на рисунку 1.

Цікавим є набір біосинтетичних кластерів, наявних у геномі цього штаму (табл. 2). По-перше, жоден з виявлених кластерів не є повністю гомологічним до відомих з даних літератури. По-друге, системою Vage I4 ідентифіковано три генетичні детермінанти синтезу різних бактеріоцинів. Один з них – пуміларин, що належить до відносно добре охарактеризованої групи циклізованих «голова до хвоста» пептидів, до якої належить інший відомий для бацил бактеріоцин – амілоцикліцин, характерний для бацил групи *Bacillus amyloliquefaciens* [21] та виявлений у іншого з досліджених штамів – *B. velezensis* ONU 553. Інші два бактеріоцини – клостицин, який раніше був відомий для кластрідій [10], та UviВ значно менш вивчені [3]. Останній бактеріоцин належить до групи так званих холін-подібних бактеріоцинів.

Холін-подібні бактеріоцини отримали свою назву завдяки подібності первинної структури та властивостей до специфічних фагових білків –



Таблиця 1

Базові показники геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Table 1

Basic genome characteristics of *Bacillus pumilus* ONU 554

Показник	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554
Розмір геному, п.н.	3642544
Вміст ГЦ пар, %	41,93
Плазміда	1
Білок-кодуючі ВРЗ	3749
Гени функціонально анотованих білків	3019
Гени не ідентифікованих білків	730
Гени тРНК	81
Гени рРНК	24
Гени профагів	3
Повтори	57

Таблиця 2

Характеристики та локалізація кластерів, виявлених у геномі

***Bacillus pumilus* ONU 554**

Table 2

Characteristics and localization of clusters, found in the genome

***Bacillus pumilus* ONU 554**

Тип кластеру	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	З	По		
Нерибосомна пептидсинтетаза	334174	416332	Ліхенізін	85
Нерибосомна пептидсинтетаза, полікетидсинтетаза 1 типу.	618110	698411	Цвіттерміцин	18
Ферменти біосинтезу терпеноїдів та сидерофорів	1051156	1,079,477	Каротиноїд	50
Беталактон	1 752368	1 780023	Фенгіцин	50
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1847856	1868573	-	-
Полікетидсинтетаза 3 типу.	1 906917	1 948017	-	-
Бактеріоцин	2257590	2267916	Пумілярин	-
Беталактон	2 394071	2 426376	-	-
Бактеріоцин	2713932	2734121	UviB	-
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2963108	2984028	-	23
Інші	3307316	3348737	Бацілізін	85
Бактеріоцин	3293027	3313906	Клостіцин	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 576143	3 625851	Бацілібактин	55



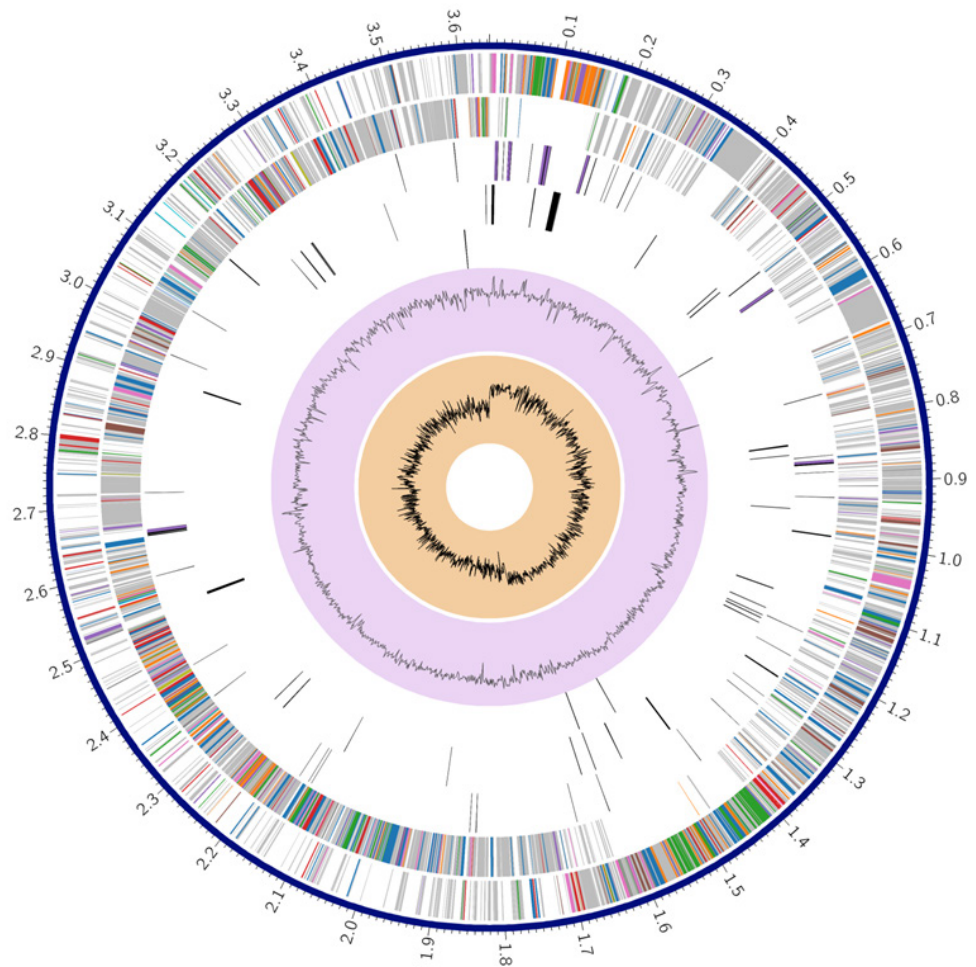


Рис. 1. Карта геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Fig. 1. Map of the genome of the *Bacillus pumilus* ONU 554

Примітка: З зовні всередину карти: контиги, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

Note: From outer to inner circles: contigs, open reading frames (ORF) on the leading strand, ORF on lagging strand, RNA genes, ORF with homology to known antimicrobial resistance genes, ORF with homology to known virulence factors, GC content, GC-skew. The colors of the ORF on the forward and reverse strands indicate the subsystem that these genes belong: blue – metabolism, green – protein processing, purple – stress response, defense, virulence, orange – cellular processes, red – bioenergetics, brown – DNA processing, pink – membrane transport, grey – RNA processing, yellow – cell envelope, light-blue – regulation and signal transfer, turquoise – miscellaneous.

холінів, які перфорують мембрану бактеріальної клітини на пізніх стадіях інфекції та сприяють її руйнуванню, в тому числі забезпечуючи вихід фагових лізоцимів назовні клітини.

Усі виявлені в геномі бактерій штаму профаги також властиві типовому штаму (рис. 2; табл. 3). Цікаво, що один з профаг-подібних елементів, щоправда, досить сильно деградований, розташований на плазміді (табл. 3, графа 3).

Таблиця 3

Профагові елементи, виявлені у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Table 3

Prophage elements, found in the genome *Bacillus pumilus* ONU 554

Профаг	Розмір (кб)	Кількість білок-кодуєчих ВРЗ	Локалізація профагового елемента, п.о.		ГЦ пар, %
			З	По	
1	47,7	65	2671911	2719632	39,61
2	41,7	36	2707120	2748899	39,9
Профаг плазміди	6,5	13	64616	71128	37,92

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 3 749 відкриті рамки зчитування, з них для 3 019 (80,5%) приписано біологічну функцію, а 730 залишилась не ідентифікованими. Визначено також 105 генів РНК, з них генів тРНК – 81, а генів рРНК – 24.



Рис. 2. Карта хромосоми *Bacillus pumilus* ONU 554 (зліва) та плазміди рONU 554 (справа) з локалізацією профагових елементів, виявлених PHASTER

Fig. 2. Map of the *Bacillus pumilus* ONU 554 chromosome (left) and plasmid (right) with localization of prophage elements, found PHASTER



Пошук за допомогою інструмента IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності в геномах штамів *Bacillus* sp. ONU 554, за допомогою ResFinder-3.2 - не виявив детермінант резистентності до аміноглікозидів, бета-лактамів, колістину, фосфоміцину, фузидової кислоти, глікопептидів, макролідів, нітроїмідазолу, оксазолідинону, хінолонів, ріфампіцину, сульфаніламідів, тетрацикліну та триметоприму. Виявлено детермінанту резистентності до хлорамфеніколу – ген *cat-86* (хлорамфенікол-ацетилтрансфераза, номер доступу до референсу в базі Genbank K00544.1). Його локалізація в хромосомі 1163650-1164311 пар основ; ідентичність гену референтній послідовності складає 93,2%.

Таким чином, можна стверджувати, що дані повногеномного секвенування є надійнішим інструментом видової ідентифікації ніж аналіз тотального жирнокислотного профілю, а штам, геном якого проаналізовано, може стати інструментом для подальшої молекулярно-біотехнологічної роботи з вивчення та гетерологічної експресії виявлених кластерів.

Послідовності хромосоми штаму *Bacillus pumilus* ONU 554 та його плазмиди рONU 554 задепоновано в базі Genbank під номерами CP060799 та CP060800, відповідно.

**В.А. Іваниця, М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук,
Н.Ю. Васильєва, Й. Калиновський**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: shtenikovnik@gmail.com

СИКВЕНС ГЕНОМА *BACILLUS PUMILUS* ONU 554, ІЗОЛІРОВАНОГО ІЗ ГЛУБОКОВОДНИХ ДОННИХ ОТЛОЖЕНИЙ ЧЕРНОГО МОРЯ

*Целью работы было проанализировать структуру генома бактерий штамма *Bacillus* sp. ONU 554, который был выделен из глубоководных донных отложений Черного моря, для его идентификации и выявления генов, которые отвечают за синтез биологически активных соединений. **Материалы и методы.** Объектом исследования были структура и характеристики генома антагонистически активных бактерий штамма *Bacillus pumilus* ONU 554. Геномная ДНК была секвенирована с использованием секвенатора HiSeq 1500 (Illumina). Сборка генома выполнена с использованием ассемблера Newbler версии 2.8, определение видовой принадлежности штамма - с помощью сервера TYGS, подсчет ANI - с использованием Ezbiocloud. Аннотирование генома осуществлялось с помощью серверов PATRIC и NCBI PGAP, поиск кластеров биосинтеза антибиотиков и бактериоцинов - с помощью antiSMASH и Bagel4, соответственно. Поиск детерминант патогенности выполнялся с помощью IslandViewer, резистентности к антибиотикам - ResFinder-3.2, поиск профаговых элементов с использованием PHASTER. **Результаты.** По данным полногеномного сравнения и 16S рРНК *Bacillus* sp. ONU 554 был идентифицирован как *Bacillus pumilus* ONU 554. Его геном имеет размер 3642544 п.о., который меньше генома обычного штамма на 90 кб за счет ряда делеций. Выявлена плазида, четыре профаговых эле-*



мента, один из которых на плазмиде, и 14 биосинтетических кластеров, из которых три относятся к бактериоцинам. **Выводы.** Таким образом, можно утверждать, что данные полногеномного секвенирования являются более надежным инструментом видовой идентификации, чем анализ тотального жирнокислотного профиля, а штамм, геном которого был проанализирован, может стать объектом для дальнейшей молекулярно-биотехнологической работы по изучению и гетерологической экспрессии выявленных кластеров.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, аннотация генома, морские бактерии, донные отложения, Черное море, бактериоцины, антимикробные соединения.

**V.O. Ivanytsia, M.D. Shtenikov, A.M. Ostapchuk,
N.Y. Vasylieva, J. Kalinowski**

Odesa I.I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska Str., Odessa, 65082, Ukraine, e-mail: shtenikovnik@gmail.com

SEQUENCING OF THE GENOME *BACILLUS PUMILUS* ONU 554 ISOLATED FROM DEEP WATER SEDIMENTS OF BLACK SEA

The aim of the work was to analyse the structure of the genome of bacteria of the strain *Bacillus* sp. ONU 554 for its identification and revealing of the genes which are responsible for production of biologically active compounds. **Materials and methods.** The object of the study were structure and characteristics of antagonistically active bacteria of the strain *Bacillus pumilus* ONU 554. Genomic DNA was sequenced using the sequencer NiSeq 1500 (Illumina). The genome was assembled using the Newbler assembler version 2.8, the species of the strain was determined using a TYGS server, and the ANI was calculated using Ezbiocloud. Genome annotation was performed using PATRIC and NCBI PGAP servers, and clusters of antibiotic and bacteriocin biosynthesis were searched using antiSMASH and Bagel4, respectively. Search for determinants of pathogenicity was performed using IslandViewer, antibiotic resistance - ResFinder-3.2, search for prophage elements using PHASTER. **Results.** According to whole genome comparison and 16S rRNA of *Bacillus* sp. ONU 554 was identified as *Bacillus pumilus* ONU 554. Its genome is 3,642,544 bp in size, which is 90 kb smaller than the genome of a type strain due to a number of deletions. A plasmid, four prophage elements, one of which is on the plasmid, and 14 biosynthetic clusters, three of which belong to bacteriocins, were identified. **Conclusions.** Thus, we can conclude that whole-genome sequencing data are a more reliable tool for species identification than analysis of the total fatty acid profile, and the strain whose genome was analyzed can become an object for further molecular biotechnological work on the exploration and heterological expression of the identified clusters.

Key words: *Bacillus pumilus*, genome annotation, marine bacteria, bottoms sediments, Black sea, bacteriocins, antimicrobial compounds.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D. S. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44, N 1. – P. 16–21.
2. Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. // *Standards in genomic sciences.* – 2010. – V. 2, N 1. – C. 117–134.
3. Aunpad R., Panbangred W. Evidence for two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4. // *Current microbiology.* – 2012. – V. 64, N 4. – C. 343–348.
4. Bertelli C., Laird M.R., Williams K.R., Lau B.Y., Hoad G et al. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – 45. – P. 30–35.
5. Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S. Y. et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47, N 1. – P. 81–87.
6. De S., Kaur G., Roy A., Dogra G., Kaushik R., Yadav P. et al. A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). // *Indian J Microbiol.* – 2010. – V. 50, N 4. – P. 412–418.
7. Garcia-Ramon D.C., Molina C.A., Osuna A., Vilchez S. An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2016. – V. 100, N 8. – P. 3637–3654.
8. Ivanytsia V.O., Shtenikov M.D., Ostapchuk A. M. [Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep-sea sediments of the Black sea]. // *Microbiology & Biotechnology.* – 2017. – V. 40, N 4. – P. 94–103. Ukrainian.
9. Joensen K.G., Scheutz F., Lund O., Hasman H., Kaas R.S., Nielsen E.M. et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – V. 52, N 5. – P. 1501–1510.
10. Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – V. 69, N 3. – P. 1589–1597.
11. Kovaleva V.A., Shalovylo Y.I., Gorovik Y.N., Lagonenko A., Evtushenkov A. N., Gout R. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine. // *Journal of Forest Science.* – 2015. – V. 61, N 3. – P. 131–137.
12. Kubicek C.P., Steindorff A.S., Chenthamara K., Manganiello G., Henrissat B., Zhang J. et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. // *BMC genomics.* – 2019. – V. 20, N 1. – P. 485.
13. Kyrpides N.C. Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. // *Nature biotechnology.* – 2009. – V. 27, N 7. – P. 627–632.



14. Lee I., Kim Y. O., Park S.C., Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for genome-based species definition of Bacteria and Archaea // 第七届全国微生物资源学术暨国际微生物系统与分类学研讨会. – 2015. – P. 180–180.
15. Logan N.A., De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman WB. John Wiley & Sons, Inc, 2015. Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00530/abstract>
16. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. // Nat Commun. – 2019. – V. 10, N 1. – P. 1–10.
17. Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). // Nucleic acids research. – 2014. – V. 42, N 1. – P. 206–214.
18. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. // Microbiology & Biotechnology. – 2018. – V. 43, N 3. – P. 82–89.
19. Tyurin A.P., Efimenko T.A., Prokhorenko I.A., Rogozhin E.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology. // Studies in Natural Products Chemistry. – Elsevier, 2018. – 55. – P. 385–441.
20. van Heel A.J., de Jong A., Song C., Viel J. H., Kok J., Kuipers O.P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46, N 1. – P. 278–281.
21. van Heel A.J., Montalban-Lopez M., Oliveau Q., Kuipers O.P. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. // Microbial genomics. – 2017. – Vol. 3. – № 10. doi: 10.1099/mgen.0.000134
22. Wattam A.R., Brettin T., Davis J.J., Gerdes S., Kenyon R., Machi D. et al. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center. In: Comparative Genomics. Methods Mol Biol. New York: Humana Press; 2018. p. 79–101.
23. Yoon S.H., Ha S.M., Lim J.M., Kwon S. J., Chun, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. // Antonie van Leeuwenhoek. – V. 2017. – V. 110, N 10. – P. 1281–1286.
24. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. // J Antimicrob Chemother. – 2012. – V. 67, N 11. – P. 2640–2644.
25. Zhao X., Kuipers O.P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. // BMC Genomics. – 2016. – V. 17, N 1. – P. 1–18.



References

1. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(1):16-21.
2. Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences.* 2010;2(1):117-134.
3. Aunpad R, Panbangred W. Evidence for two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current microbiology.* 2012;64(4):343-348.
4. Bertelli C, Laird MR, Williams KR, Lau BY, Hoad G et al. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research.* 2017;45:30-35.
5. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee S Y et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(1):81-87.
6. De S, Kaur G, Roy A, Dogra G, Kaushik R, Yadav P et al. A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). *Indian J Microbiol.* 2010;50(4):412-418.
7. Garcia-Ramon, DC et al. An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology and biotechnology.* 2016;100(8):3637-3654.
8. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM. [Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep-sea sediments of the Black sea]. *Microbiology & Biotechnology.* 2017;40(4):94-103. Ukrainian.
9. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin. Microbiol.* 2014;52(5):1501-1510.
10. Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003;69(3):1589-1597.
11. Kovaleva VA, Shalovylo YI, Gorovik YN, Lagonenko A, Evtushenkov AN, Gout R. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine. *Journal of Forest Science.* 2015;61(3):131-137.
12. Kubicek CP, Steindorff AS, Chenthamara K, Manganiello G, Henrissat B, Zhang J. et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC genomics.* (2019);20(1):485.
13. Kyrpides, NC. Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. *Nature biotechnology.* 2009;27(7):627-632.
14. Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J OrthoANI: an improved algorithm and software for genome-based species definition of Bacteria and Archaea // 第七届全国微生物资源学术暨国际微生物系统与分类学研讨会. 2015:180-180.



15. Logan NA, De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman W B John Wiley & Sons, Inc, 2015. Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00530/abstract>
16. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-10.
17. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research.* 2014; 42(1):206-214.
18. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. *Microbiology & Biotechnology.* 2018;43(3):82-89.
19. Tyurin AP, Efimenko TA, Prokhorenko IA, Rogozhin EA, Malanicheva IA, Zenkova VA. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology. *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier, 2018. 55:385-441.
20. van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers O P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(1):278-281.
21. van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Oliveau Q, Kuipers O P. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microbial genomics.* 2017;3(10). doi: 10.1099/mgen.0.000134
22. Wattam AR, Brettin T, Davis JJ, Gerdes S, Kenyon R, Machi D et al. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center. In: *Comparative Genomics. Methods Mol Biol.* New York: Humana Press; 2018. p. 79-101.
23. Yoon SH, Ha SM, Lim JM, Kwon SJ, Chun, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2017;110(10):1281-1286.
24. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640-2644.
25. Zhao X, Kuipers O P Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics.* 2016;17(1):1-18.

Стаття надійшла до редакції 17.11.2020 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

Науковий журнал «Мікробіологія і біотехнологія» запрошує Вас до співпраці з питань висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології і біотехнології.

Програмні цілі видання: висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології та біотехнології, об'єктами яких є прокаріотні (бактерії, архебактерії), еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми та віруси.

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностичуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

Мова (мови) видання: українська, російська, англійська.

Рубрики журналу: «Оглядів та теоретичні статті», «Експериментальні праці», «Дискусії», «Короткі повідомлення», «Хроніка наукового життя», «Сторінки історії», «Ювілеї і дати», «Рецензії», «Книжкова полиця».

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють автори.

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-5/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання мети статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом до 18 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

- назва статті великими літерами;
- прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; список використаної літератури мовою оригіналу цитованої статті, список використаної літератури (Referens) англійською мовою (за вимоги міжнародних наукометричних баз).

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

Враховуючи, що реферат відображає основний зміст статті і використовується в інформаційних, в тому числі автоматизованих системах для пошуку документів та інформації, необхідно дотримуватися певних вимог при його написанні:

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200–250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

У кінці тексту статті указати прізвища, імена та по-батькові усіх авторів, поштову адресу, телефон, факс, e-mail (для кореспонденції).

Стаття має бути підписана автором (усіма авторами) з зазначенням дати на останній сторінці.



Автори несуть повну відповідальність за бездоганне мовне оформлення тексту, особливо за правильну наукову термінологію (її слід звіряти з фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абрєвіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

Розділ «Матеріали і методи»:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті.

До рисунків мають бути підписи не згруповані з ним і не вставлені в об'єкт рисунка.

Позначення на рисунку мають бути інтегровані в нього, тобто копіюватися разом з рисунком, а не окремими частинами.

Всі ілюстрації мають бути розміщені в файлі рукопису, також обов'язково додані до електронного варіанту у вигляді файлів формату JPEG.

Підписи, а також пояснення, примітки до таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською мовою.



Розділ «Результати досліджень та їх обговорення» має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.

Список використаної літератури

1. Список використаної літератури в оригіналі цитованої статті складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця). Якщо перший автор у декількох працях один і той самий, то праці розміщуються у хронологічному порядку. Список посилань треба пронумерувати, а у тексті посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел.

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

2. Список використаної літератури англійською мовою (Referens), за вимогами міжнародних наукометричних баз.

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

Прізвища, імена та по-батькові авторів, назву цитованого видання (журнал, монографія, збірник тощо) наводять послуговуючись безкоштовними сайтами (<http://www.easybib.com/>, <http://www.bibme.org/>, <http://www.sourceaid.com/>, <https://www.citethisforme.com/>), що дозволяють здійснити переклад з використанням однієї з міжнародних систем транслітерації.

Назви статей наводять англійською мовою.

Порядок подання посилань Referens (список 2) має повністю співпадати зі списком використаної літератури (список 1).

Зразки посилання літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англійські джерела)

На книги

Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.

Патика В. П., Тихонович І. А. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

Промышленная микробиология / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

Методы общей бактериологии. В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.; Т. 2. – 470 с.; – Т. 3. – 263 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

Rogers H., Perkins H., Ward I. Microbial cell walls and membranes. – London; New York: Fcfd. Press, 1980. – 364 p.

На журнальні статті

Подгорский В. С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *Мікробіол. журн.* – 1998. – 60, № 5. – С. 27–42.



Андреюк Е. И., Козлова И. А., Рожанская А. М. Микробиологическая коррозия строительных материалов // Биоповреждения в строительстве. – М.: Стройиздат, 1984. – С. 209–221.

Глоба Л. І., Подорван Н. І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // Вісник ОНУ. – 2001. – т. 6, в. 4. – С. 65 – 67.

Eaton R. W., Ribbons D. V. Utilization of phtalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. – 1982. – 132, № 2. – P. 185–188.

На тези доповідей

Мацелюх Б. П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину Е // Міжнародна наук. конф. «Мікробні біотехнології» (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. – О.: «Астропринт», 2006. – С. 17.

На депоновані наукові роботи

1. Лопатина Н. В., Терентьев А. Н., Наталич Л. А., Янгулов Ш. У. Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-В92.

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 17 с.

На автореферати дисертацій

Онищенко О. М. Таксономія і антибіотична активність *Alteromonas*-подібних бактерій Чорного моря: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2003. – 21 с.

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

Стиль шрифту для англomовного варіанту списку джерел – NLM (National Library of Medicine), зразок:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49–53.

Статті в журналах:

DeLong EF, Karl DM. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2015;(437):336–342.

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

Best RJ. Tomato spotted wilt virus. In: Advances Virus Res Eds Smith KM, Lauffer MA. Academic Press, New York, 1968:65–146.

Speissel B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours. Berlin New York: Springer-Verlag. 1989. 12.

Sastry SK. Seed-borne plant virus diseases. India: Springer, 2013. 327 p.

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, Djourmanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,
можливі лише за умови посилання на джерело інформації
та з дозволу редакційної колегії.
Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка С. О. Остапенко

Підписано до друку 18.12.2020 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 5,20. Тираж 100 пр.
Зам. № 2187.

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39
e-mail: druk@onu.edu.ua